



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

# **Mapeo, identificación y estudios funcionales del gen asociado a la hipoacusia DFNA50**

**TESIS DOCTORAL**

ÁNGELES MENCÍA RODRÍGUEZ

MADRID, 2010



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Mapeo, identificación y estudios  
funcionales del gen asociado a la  
hipoacusia DFNA50**

**TESIS DOCTORAL**

ÁNGELES MENCÍA RODRÍGUEZ  
MADRID, 2010





DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

# **Mapecto, identificación y estudios funcionales del gen asociado a la hipoacusia DFNA50**

Memoria que, para optar al título de Doctor,  
presenta Ángeles Mencía Rodríguez,  
Licenciada en Biología

Director de Tesis:  
Dr. Miguel Ángel Moreno Pelayo

Unidad de Genética Molecular  
Hospital Ramón y Cajal  
Madrid, 2010





Hospital Universitario  
Ramón y Cajal

Comunidad de Madrid

Don Miguel Ángel Moreno Pelayo, Doctor en Ciencias Biológicas e Investigador Estabilizado I3SNS en la Unidad de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal,

**CERTIFICA:** Que Doña Ángeles Mencía Rodríguez ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título: “Mapeo, identificación y estudios funcionales del gen asociado a la hipoacusia DFNA50”.

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del mismo, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor.

En Madrid, a 19 de Enero de 2010

Dr. Miguel Ángel Moreno Pelayo  
Unidad de Genética Molecular  
Hospital Ramón y Cajal, Madrid

VºBº Jesús Cruces  
Tutor y director del departamento  
de Bioquímica. Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid



*A mi familia  
y a todas aquellas que cómo la mía  
se quedaron esperando a los que íbamos  
en esos trenes el 11 de Marzo de 2004.*



*“No hay plazo que no llegue ni deuda que no se pague”*

*Refrán popular*

*“...Bachelard escribió: Los grandes sabios son útiles a la ciencia  
en la primera mitad de su vida, dañinos en la segunda...”*

*La edad de la discreción*

*Simone de Beauvoir*





## Agradecimientos

La elaboración de esta memoria de Tesis Doctoral ha supuesto para mí, un gran esfuerzo. Ponerme delante de un papel en blanco y comenzar a ordenar y relacionar todo lo aprendido y hecho durante estos últimos años y, además, plasmarlo en un lenguaje entendible por todos, ha sido muy difícil, bastante más que toda la labor experimental en que se apoya este trabajo. A pesar de todo, he conseguido llevar a término este proyecto. Pero no lo he logrado sola, hay muchísima gente detrás a quien debo dar las gracias.

En primer lugar debo agradecer al Dr. Felipe Moreno que me acogiera en la Unidad. Él siempre me ha mostrado su apoyo dándome buenos consejos tanto científicos como personales. Al Dr. Miguel Ángel Moreno Pelayo como mi director de Tesis que ha sido y como maestro en estos años de trabajo le agradezco su inestimable ayuda y estimulación constante durante estos años en los que me he formado a su lado. Muchas gracias, Miguel Ángel, por tu tiempo y por volcarte en este proyecto desde el principio. El esfuerzo ha dado sus frutos.

Pero no sólo a ellos tengo que dar las gracias sino también a los compañeros del laboratorio. Aquí quiero hacer una mención especial a la Dra. Silvia Modamio que, aunque no figura como mi directora, moralmente, lo ha sido. Con ella comencé este trabajo y suya es también esta Tesis. Todos los demás compañeros actuales, Montse, Leticia, Matías, Fernando, Lucía, Laura, Helena, María, Marta, Gema, Luciana, Ignacio, Francisco, Rosa, Manuela, Romina, Luis, Jose Luis, María, M<sup>a</sup>Ángeles, Yoli, Eli, Fran, Alba, Germán, Concha, Nati, Ana, Carmen, Lolo y María José y los que dejaron el laboratorio, mi gran amigo Viñuela, Toñi, Alejandra, Dani, Isabel, Araceli, han realizado una importante labor. Siempre unos más que otros, porque cada cual tiene sus filias y sus fobias, todos me han echado una mano, y por eso muchas gracias por socorrerme, enseñarme, aguantarme, haber tomado cafés eternos conmigo, por haberos reído conmigo y a veces de mí y también haber llorado conmigo cuando lo he necesitado. A los compañeros del Servicio Técnico del Hospital Ramón y Cajal les doy las gracias por mantener y reparar tanto el lugar como los equipos que he necesitado para la realización de esta Tesis.

Agradezco, así mismo, al Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto de Salud Carlos III, (Beca BEFI 02/9264 y Proyectos de Investigación CP03/0014 y PI08/0045), al Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto de Investigación SAF2008-03216), al CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER CB06/07/0048) y a la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Ramón y Cajal (Beca Puente) la financiación de mi periodo predoctoral en la Unidad.

Y por último y por que me parece justo, le agradezco a mis padres Julián y Celia el haberme dado el ser y ayudarme a ser quien soy, el apoyo que me han ofrecido en todos los momentos difíciles y el estímulo recibido cuando me flaqueaban las fuerzas. A mis hermanas Rosi y Cristina debo agradecerles su incondicional ayuda y las preguntas indiscretas que muchas veces me han hecho reflexionar, lo que me ha permitido superar esos pequeños baches que todo proceso experimental conlleva. A Raúl, mi pareja, que llegó a la vez que la primera mutación que se describe en esta Tesis y está siendo el motor de mi entusiasmo en esos momentos de debilidad y de querer tirar la toalla que me han perseguido a lo largo de estos últimos meses. Muchas gracias, mi vida, a ti y a tu familia, Bienvenido, Angelines, Marta y todos los demás por el ánimo que me habeis infundido.

Gracias a todos mis amigos y amigas (ellos saben quienes son) por vuestra colaboración y apoyo.

A todos muchas gracias por haber sido mis compañeros de viaje.

Ángeles



## **RESUMEN**

Las sorderas no sindrómicas hereditarias (SNSH) representan el déficit sensorial más frecuente y se caracterizan por presentar una alta heterogeneidad clínica y genética. Hasta la fecha se han descrito más de 100 *loci* implicados en este trastorno y en aproximadamente la mitad de ellos, se han identificado los genes asociados que codifican una variedad de proteínas con una gran diversidad estructural y funcional. En el presente trabajo describimos el mapeo de un nuevo *locus* de SNSH autosómica dominante, DFNA50, en la región cromosómica 7q32, y la identificación de un RNA con función reguladora, un microRNA (miRNA) denominado miR-96 que se expresa en las células ciliadas del oído interno, como el gen asociado a esta patología. El miR-96 es el primer miRNA implicado en sordera, y lo que es más destacable, es el primero que se asocia a una patología monogénica de herencia mendeliana. Las mutaciones identificadas modifican la secuencia correspondiente a la región *seed* del miRNA maduro, que es crucial para la especificidad de reconocimiento de sus mensajeros diana. Los ensayos funcionales llevados a cabo muestran que ambas mutaciones ejercen un fuerte impacto sobre la biogénesis y la capacidad de silenciamiento del miR-96. Por tanto, postulamos que dichas mutaciones alteran el papel regulador que miR-96 desempeña en el mantenimiento de los perfiles de expresión génica en las células ciliadas, necesarios para su normal funcionamiento.

## **SUMMARY**

Hereditary non-syndromic hearing loss (HNSHL) represents the most common sensory deficit in human characterized by high clinical and genetic heterogeneity. Up to now, more than 100 deafness-associated loci have been mapped, and in about half of them, the associated genes have been identified which encode a variety of proteins with a high structural and functional diversity. In the present work we describe the mapping of a novel autosomal dominant HNSHL *locus*, DFNA50, at chromosome region 7q32, and the identification of a regulatory RNA, a microRNA (miRNA) named miR-96 that is expressed in the hair cells of the inner ear, as the gene associated with this pathology. miR-96 is the first miRNA implicated in hearing impairment and, most important, this is the first miRNA linked to a monogenic Mendelian disorder. The identified mutations modify the sequence corresponding to the *seed* region in the mature form of miR-96, which is known to be crucial for the specificity of target recognition. Our functional analysis show the identified mutations have a strong impact on miR-96 biogenesis and result in a significant reduction of mRNA targeting. Therefore, we propose that these mutations alter the regulatory role of miR-96 in maintaining gene expression profiles in hair cells required for their normal function.



# ÍNDICE



<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>21</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>25</b>
<b>1. Anatomía y funcionamiento del oído en mamíferos .....</b>	<b>25</b>
1.1. Anatomía general del oído.....	25
1.2. Anatomía de la cóclea adulta.....	25
1.3. Fisiología de la audición .....	28
<b>2. La sordera: aspectos generales .....</b>	<b>29</b>
2.1. Epidemiología.....	29
2.2. Clasificación .....	30
<b>3. Genética de las hipoacusias hereditarias no sindrómicas .....</b>	<b>31</b>
<b>4. Los microRNAs .....</b>	<b>34</b>
4.1. Introducción histórica .....	34
4.2. Genes y biogénesis .....	35
4.2.1. Etapa nuclear: desde el pri-miRNA al pre-miRNA .....	35
4.2.2. Etapa citoplasmática: desde el pre-miRNA hasta el miRNA maduro ....	37
4.2.3. Formación del complejo ribonucleoproteico efector miRISC .....	37
4.3. Reconocimiento de los mRNAs diana y mecanismos de acción de los miRNAs .....	37
4.3.1. Mecanismos de represión de la traducción mediados por miRNAs .....	38
4.3.2. Localización subcelular del proceso de silenciamiento .....	39
4.4. miRNAs y enfermedad. Mecanismos patogénicos.....	40
4.5. miRNAs en el oído interno de mamíferos .....	41
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>

<b>PACIENTES Y MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
<b>1. Pacientes.....</b>	<b>49</b>
<b>2. Estudio genético molecular de la familia S403 .....</b>	<b>49</b>
2.1. Genotipado.....	49
2.2. Análisis de ligamiento .....	50
2.3. Análisis de genes candidatos .....	51
2.3.1. Amplificación por PCR.....	51
2.3.2. Secuenciación directa.....	52
<b>3. Búsqueda de mutaciones en los genes <i>MIRN182</i>, <i>MIRN183</i> y <i>MIRN96</i>.....</b>	<b>52</b>
3.1. Búsqueda de mutaciones por DHPLC .....	52
3.2. Detección de las mutaciones miR-96+13G>A y miR-96+14C>A en el gen <i>MIRN96</i> .....	54
<b>4. Análisis de la biogénesis del hsa-miR-96.....</b>	<b>55</b>
4.1. Generación de vectores de expresión del miR-96 primario (pri-miR-96) silvestre y sus variantes alélicas miR-96+13G>A y miR-96+14C>A.....	55
4.2. Transfecciones y Northern blot.....	56
<b>5. Análisis funcional de las variantes alélicas del miR-96 .....</b>	<b>57</b>
5.1. Diseño y construcción de vectores y siRNAs.....	57
5.2. Transfecciones y ensayos de actividad de la Luciferasa.....	60
<b>6. Direcciones WEB.....</b>	<b>61</b>
6.1. Bases de datos .....	61
6.2. Información sobre miRNAs: secuencias, estructuras y dianas .....	61



<b>RESULTADOS</b>	65
<b>1. Datos clínicos de las familias con hipoacusia DFNA50</b>	65
1.1. Familia S403	65
1.2. Familia S1334	66
<b>2. Mapeo del <i>locus</i> DFNA50</b>	66
<b>3. Análisis de los genes candidatos</b>	70
3.1. Selección de genes candidatos	70
3.2. Exclusión de genes candidatos	70
3.3. Validación del gen asociado a la sordera DFNA50	73
<b>4. Búsqueda de mutaciones en los genes <i>MIRN96</i>, <i>MIRN 183</i> y <i>MIRN182</i></b>	75
<b>5. Análisis funcional de las mutaciones <i>miR96+13G&gt;A</i> y <i>miR96+14C&gt;A</i></b>	78
5.1. Análisis bioinformático de la estructura secundaria de la molécula precursora del <i>miR-96</i> (pre- <i>miR-96</i> ) mediante el programa MFOLD	78
5.2. Biogénesis y procesamiento	79
5.3. Efecto de las mutaciones sobre la capacidad reguladora de <i>miR-96</i>	81
5.3.1. Dianas directas	81
5.3.2. Dianas adquiridas	85
<b>DISCUSIÓN</b>	89
<b>1. Efecto de las mutaciones <i>miR-96+13G&gt;A</i> y <i>miR-96+14C&gt;A</i>     a nivel molecular</b>	89
<b>2. Características fenotípicas asociadas a las mutaciones <i>miR-96+13G&gt;A</i>     y <i>miR-96+14C&gt;A</i></b>	92
<b>CONCLUSIONES</b>	99
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	103

<b>ANEXOS</b> .....	117
<b>Anexo 1</b> .....	117
<b>Anexo 2</b> .....	121
Anexo 2A .....	121
Anexo 2B .....	122
Anexo 2C .....	123
<b>PUBLICACIONES</b> .....	127

## **ABREVIATURAS**

CCs	Células ciliadas
CCE	Célula Ciliada Externa
CCI	Célula Ciliada Interna
CEPH	Centro de Estudios de Polimorfismos en Humano ( <i><u>C</u>entre d'<u>E</u>tude du <u>P</u>olymorphisme <u>H</u>umain</i> )
Cols.	Colaboradores
cM	CentiMorgan
CREC	Familia de proteínas ( <u>C</u> ab-45, <u>R</u> eticulocalvina, <u>E</u> rc-55 y <u>C</u> alumenina)
dB	Decibelios
DFN	<i>Locus</i> de hipoacusia no síndrómica ligados al cromosoma X ( <i><u>D</u>ea<u>F</u>N<u>e</u>ss</i> )
DFNA	<i>Locus</i> de hipoacusia no síndrómica de herencia autosómica dominante
DFNB	<i>Locus</i> de hipoacusia no síndrómica de herencia autosómica recesiva
DHPLC	Cromatografía en fase líquida de alta resolución en condiciones desnaturalizantes ( <i><u>D</u>esnaturalizing <u>H</u>igh <u>P</u>erformance <u>L</u>iquid <u>C</u>hromatography</i> )
DMEM	Medio de cultivo ( <i><u>D</u>ubelcco's <u>M</u>odified <u>E</u>agle <u>M</u>edium</i> )
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EST	Secuencia expresada ( <i><u>E</u>xpressed <u>S</u>equence <u>T</u>ag</i> )
EtBr	Bromuro de Etidio
FAM	6-carboxifluoresceína
GDB	Base de datos sobre el genoma humano ( <i><u>G</u>enome <u>D</u>ata <u>B</u>ank</i> )
HEX	Hexacloro-6-carboxifluoresceína
HUGO	Organización del Genoma Humano ( <i><u>H</u>Uman <u>G</u>enome <u>O</u>rganization</i> )
Hz	Herzios
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma ( <i><u>I</u>nn<u>e</u>r <u>R</u>ibosomal <u>E</u>ntry <u>S</u>ite</i> )
K <sup>+</sup>	Catión/es potasio
kb	Kilobase
kHz	Kiloherzio
LNA	Nucleótidos en conformaión cerrada ( <i><u>L</u>ocked <u>N</u>ucleid <u>A</u>cid</i> )
MEB	<u>M</u> icroscopía <u>E</u> lectrónica de <u>B</u> arrido
miRISC	Complejo inductor de silenciamiento dependiente de miRNAs ( <i><u>m</u>iRNA-<u>I</u>nducing <u>S</u>ilencing <u>C</u>omplex</i> )
miRNA	MicroRNA

mRNA	RNA mensajero
MT	<u>M</u> embrana <u>T</u> ectoria
Na <sup>+</sup>	Catión/es sódio
NCBI	Base de datos ( <i><u>N</u>ational <u>C</u>enter of <u>B</u>io<u>t</u>echnology <u>I</u>nformation</i> )
P (nº)	Día postnatal (nº)
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i><u>P</u>olimerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction</i> )
piRNA	RNA asociados a proteínas PIWI
p/v	Relación peso/volumen
PIWI	Familia de proteínas ( <i><u>P</u>-element <u>I</u>nduced <u>W</u>impy testis</i> )
pre-miRNA	MicroRNA precursor
pri-miRNA	MicroRNA primario
rRNA	RNA ribosómico
siRNA	RNA de interferencia
SDS	Dodecil sulfato sódico
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido ( <i><u>S</u>ingle <u>N</u>ucleotide <u>P</u>olimorphism</i> )
SSC	Tampón de citrato sódico salino
STSs	Secuencia única se DNA ( <i><u>S</u>equence <u>T</u>agged <u>S</u>ite</i> )
TAC	<u>T</u> omografía <u>A</u> xial <u>C</u> omputerizada
TBE	Tampón <u>T</u> ris <u>B</u> orato <u>E</u> DTA
TEAA	Acetato de trietilamonio
TET	Tetracloro-6-carboxifluoresceína
tRNA	RNA de transferencia
U	Unidad (de enzima)
UA	<u>U</u> nidades <u>A</u> rbitrarias
UTR	Región no traducida ( <i><u>U</u>n<u>T</u>ranslated <u>R</u>egion</i> )
v/v	Relación volumen/volumen
Z	Valor de <i>LOD score</i>
Z <sub>MAX</sub>	Valor de <i>LOD score</i> máximo
θ	Fracción de recombinación
θ <sub>MAX</sub>	Fracción de recombinación para Z <sub>MAX</sub>

# INTRODUCCIÓN



## **INTRODUCCIÓN**

### **1. Anatomía y funcionamiento del oído en mamíferos**

#### **1.1. Anatomía general del oído**

El sentido de la audición reside en el oído, órgano sensorial par que en humanos, se sitúa a ambos lados de la cabeza, en la región temporal. El oído se puede dividir en tres partes (Fig. 1A):

- El **oído externo**, está formado por el pabellón auricular u oreja y el canal auditivo externo que está limitado en su parte interna por el tímpano.

- El **oído medio**, que comprende el tímpano o membrana timpánica, la cavidad timpánica, que se sitúa dentro del hueso temporal y está comunica con la nasofaringe a través de la trompa de Eustaquio, y la cadena de huesecillos (martillo, yunque y estribo).

- El **oído interno** o laberinto, está alojado en el hueso temporal y lo forman dos sistemas sensoriales distintos: el vestíbulo (comprendido por el sáculo, el utrículo y tres canales semicirculares) responsable del equilibrio, y la cóclea, responsable de la audición. Su función es la de transformar los estímulos mecánicos (sonoros y de aceleración) en impulsos nerviosos, que se transmiten al sistema nervioso central a través de las fibras del octavo par craneal o nervio auditivo. Tanto el vestíbulo como la cóclea están formados por una serie de cavidades y conductos interconectados que constituyen el laberinto membranoso. Rodeando al laberinto membranoso y protegiéndolo se encuentra el laberinto óseo (Fig. 1B y C).

#### **1.2. Anatomía de la cóclea adulta**

La cóclea humana es un conducto membranoso de unos 3-3.5 cm de longitud que se enrolla sobre sí mismo describiendo dos vueltas y media en torno a un eje central llamado modiolos, por donde viaja el nervio coclear que forma parte del octavo par craneal. Externamente, la cóclea está protegida por una envoltura ósea denominada cápsula ótica. En el interior, el conducto, lleno de fluido, se divide en tres rampas: rampa vestibular, rampa coclear o media y rampa timpánica (Fig. 1C).

Las rampas vestibular y timpánica se unen en la parte apical de la cóclea, el helicotrema y se comunican con el oído medio a través de dos discontinuidades en la envoltura ósea: la ventana oval que conecta el oído medio con la rampa vestibular y en ella

se apoya la platina del estribo, y la ventana redonda que comunica el oído medio con la rampa timpánica. La rampa coclear está delimitada por la membrana de Reissner (MR) que la separa de la rampa vestibular y por la membrana basilar (MB), que es el límite anatómico con la rampa timpánica (Fig. 1C).

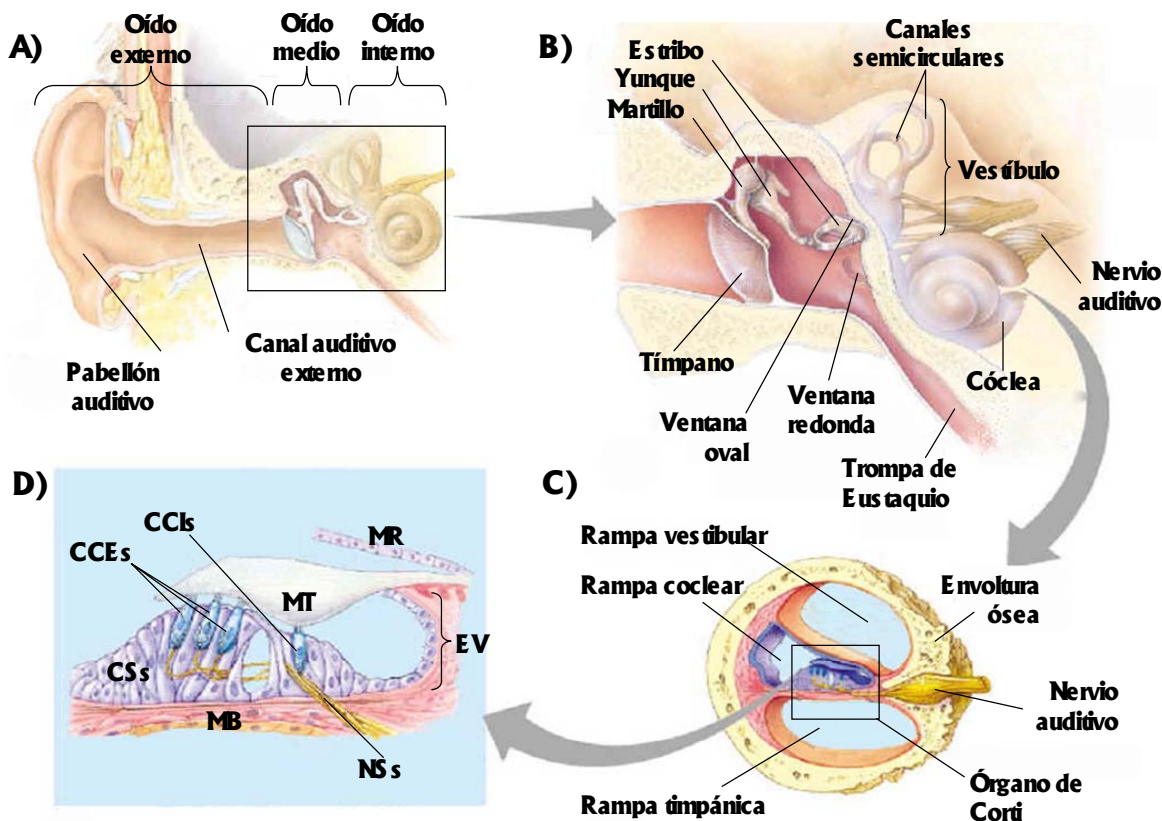


Figura 1. Anatomía del oído. A) Representación gráfica del oído en la que se marcan sus diferentes regiones. B) Detalle del oído medio e interno en el que se destacan las estructuras básicas que los componen. C) Representación gráfica de una sección de la cóclea en la que aparecen señaladas las partes que forman el laberinto. D) Componentes básicos del órgano de Corti, órgano de la audición propiamente dicho. CSs: células de soporte; CCEs: células ciliadas externas; CCIs: células ciliadas internas; MB: membrana basilar; MT: membrana tectoria; NSs: neuronas sensitivas; MR: membrana de Reissner; EV: estría vascular.

La composición iónica del fluido que ocupa las rampas vestibular y timpánica, la perilinfa, es similar a la del líquido cerebroespinal del que deriva. Sin embargo, al contrario que en la perilinfa, el fluido que ocupa la rampa media, denominado endolinfa, posee una mayor concentración de cationes potasio ( $K^+$ ) que de cationes sodio ( $Na^+$ ). Esta diferencia en la concentración iónica genera una diferencia de potencial entre ambos fluidos de alrededor de +80mV que se denomina potencial endococlear. El órgano de la audición propiamente dicho, el órgano de Corti (Fig. 1D), se encuentra en la rampa coclear y se apoya sobre la membrana basilar. En el órgano de Corti existen dos tipos de células,



las células de soporte, clasificadas según su localización y su función concreta, y las células sensoriales que reciben el nombre de células ciliadas (CCs) y se disponen formando hileras longitudinales, a lo largo de la cóclea. Se diferencian dos tipos: las células ciliadas internas (CCIs) dispuestas en una única hilera, y las células ciliadas externas (CCEs) que forman tres hileras. Las células sensoriales, y por tanto, transmisoras de la información auditiva son las CCIs; las CCEs, se caracterizan principalmente por presentar capacidad motil, aunque también poseen rasgos sensoriales, y son responsables de la amplificación de la respuesta de la cóclea al estímulo sonoro y de la sintonización fina de las frecuencias (Ospeck y cols. 2006). Ambos tipos de CCs se caracterizan por poseer en su parte apical un penacho de *microvilli* rígidos llamados estereocilios que poseen en su interior un haz de filamentos de actina ordenados en paralelo que aporta rigidez a su estructura. La disposición de los estereocilios es característica del tipo de célula. En las CCIs, por ejemplo, los estereocilios están dispuestos formando un penacho lineal, mientras que en las CCEs, éstos se disponen en un penacho en forma de “V” o “W”. En cualquier caso, dicho penacho está formado por tres hileras de estereocilios cuya longitud aumenta progresivamente desde la hilera interna a la más externa, situada hacia la parte lateral de la cóclea, adoptando una conformación en escalera. Cada estereocilio establece uniones con los estereocilios adyacentes por la parte basal, lateral o apical. Estas últimas uniones denominadas *tip links*, se establecen entre los estereocilios de hileras consecutivas. La región apical de los estereocilios que componen la hilera más externa de las CCEs, se inserta en la membrana tectoria, que es una estructura gelatinosa compuesta por matriz extracelular que se tiende sobre el órgano de Corti (Fig. 1D). La membrana basilar sobre la que se apoya el órgano de Corti, tiene la capacidad de vibrar en respuesta al estímulo sonoro; se ancla en su parte interna a la lámina espiral ósea mientras que su parte externa se prolonga en un ligamiento flexible o ligamento espiral que confiere elasticidad al movimiento de dicha membrana. Las raíces del ligamento espiral se introducen en otra importante estructura denominada estría vascular, que está implicada en el mantenimiento del potencial endococlear y el enriquecimiento en  $K^+$  de la endolinfa. Todas las células que conforman el órgano de Corti están unidas en su parte apical por uniones estrechas (*tight junctions*) que permiten el aislamiento electroquímico del interior de la rampa media, necesario para el mantenimiento del potencial endococlear.

### 1.3. Fisiología de la audición

La audición del sonido comienza con la captación de las ondas sonoras por el pabellón auditivo y la conducción de las mismas a través del canal auditivo externo hasta el tímpano. En el oído medio, la vibración del tímpano se transmite por la cadena de huesecillos hasta alcanzar la ventana oval. Por acción de la platina del estribo sobre la ventana oval, el sonido se transforma en una onda de presión que recorre la perilinfa de la rampa vestibular. La cóclea presenta una organización tonotópica, de forma que la sensibilidad a las distintas frecuencias varía gradualmente de la base (donde se procesan las frecuencias altas) al ápex (responsable del procesamiento de las frecuencias bajas). Por tanto, la onda de presión generada hace vibrar por resonancia a la membrana basilar en un punto concreto dependiendo de la frecuencia del sonido recibido. El proceso por el cual las fuerzas mecánicas de las ondas auditivas se transforman en impulsos nerviosos, se denomina mecanotransducción (Hudspeth 1989). El movimiento de la membrana basilar provoca el desplazamiento lateral de los estereocilios de mayor longitud de las CCEs que están insertados en la superficie de la membrana tectoria y se transmite a todos los estereocilios del penacho gracias a las uniones apicales (*tip links*) que los conectan. El movimiento de los estereocilios abre canales iónicos dependientes de tensión mecánica asociados a las uniones apicales, a través de los cuales pasan  $K^+$  a favor de gradiente electroquímico. La entrada de iones con carga positiva, despolariza la célula, lo que activa el movimiento contráctil de las CCEs que amplifica la oscilación de la membrana basilar (fenómeno conocido como “amplificación” coclear). Como resultado, las CCEs también se despolarizan por la entrada pasiva de  $K^+$  en su interior a través de canales asociados a mecanorreceptores (se desconoce si el mecanorreceptor y el canal son la misma entidad molecular) que se activan/abren como consecuencia del movimiento de los estereocilios. La despolarización desencadena la entrada de calcio a través de canales específicos sensibles a voltaje, lo que provoca la fusión de vesículas sinápticas con la membrana plasmática y la liberación de neurotransmisores (glutamato) al espacio sináptico. Allí, las células nerviosas que forman las fibras aferentes son excitadas y conducen los impulsos eléctricos hacia el sistema nervioso central.

Una vez que se ha transmitido la información, las células deben repolarizarse lo más rápidamente posible para quedar preparadas para la recepción de nuevos estímulos. Dos factores contribuyen a la repolarización: el mecanismo de “adaptación” que existe en los estereocilios, que permite que los canales de mecanotransducción se cierren antes de que los estereocilios vuelvan a su posición inicial mediante la relajación de las uniones

apicales (dependiente de calcio), y la apertura de canales dependientes de voltaje localizados en la membrana basolateral, que permite una fuga de  $K^+$  hacia el espacio extracelular bañado por perilinfa de donde es captado por las células de soporte que lo conducen a través de un sistema de uniones comunicantes (*gap junctions*) hacia la región de la estría vascular desde donde es vertido de nuevo a la endolinfa.

El oído, y la cóclea en concreto, es un sistema muy complejo desde el punto de vista estructural y funcional. En humanos, las células sensoriales del órgano de Corti no tienen capacidad de regeneración por lo que cualquier alteración o agresión sobre ellas se traduce en una pérdida de función que se va a manifestar como una disminución de la capacidad auditiva.

## **2. La sordera: aspectos generales**

### **2.1. Epidemiología**

La sordera o hipoacusia es el trastorno sensorial más frecuente en humanos. En los países desarrollados, alrededor de un 6-8% de la población presenta déficit auditivo en algún grado que afecta a la comunicación normal. Aproximadamente 1 de cada 1000 niños padece sordera grave o profunda en el nacimiento o primera infancia (periodo prelocutivo, previo a la adquisición del lenguaje). De estos casos, se ha estimado que alrededor del 60% tendría un origen genético (datos referentes a países desarrollados) (Morton 1991; Marazita y cols. 1993). Con la edad, el porcentaje de individuos con hipoacusia aumenta de forma significativa; se calcula que alrededor de un 5% de la población por debajo de los 45 años y un 50% de las personas de más de 80 años padecen un trastorno de la audición que merma su capacidad de comunicación (Petersen 2002). Las sorderas postlocutivas, en general, son consideradas como el resultado de la combinación entre factores genéticos y ambientales. Cabe destacar de entre ellas, la otoesclerosis y la presbiacusia (pérdida auditiva relacionada con la edad) en las que el componente genético domina sobre el ambiental (Kalatzis y Petit 1998; Petersen 2002).

La pérdida auditiva de cualquier grado y a cualquier edad en la que aparezca afecta negativamente a la comunicación del individuo con su entorno. La sordera prelocutiva da lugar a problemas en la adquisición del lenguaje y por tanto afecta negativamente al desarrollo social e intelectual del sujeto que la padece. La sordera postlocutiva, en cambio, puede empeorar con el tiempo y contribuye al progresivo aislamiento del individuo. En cualquier caso la detección precoz de la hipoacusia puede ayudar al menos, a atenuar sus efectos negativos en la integración del individuo en la sociedad.

### 2.2. Clasificación

Las hipoacusias pueden clasificarse en base a sus características clínicas y genéticas. Clínicamente, las sorderas se definen en función de los siguientes criterios (Willems 2000; Tekin y cols. 2001; Smith y Van Camp 2009):

- Asociación: la hipoacusia puede aparecer acompañada de anomalías en el oído externo u otros órganos (por ejemplo, retinitis pigmentosa, bocio, nefritis, problemas dermatológicos, etc) y entonces se habla de **hipoacusia sindrómica**; o puede aparecer como único signo clínico, causada por anomalías del oído interno o medio, en cuyo caso se habla de **hipoacusia no sindrómica**.
- Localización del defecto: cuando el defecto está en el oído externo o medio, la sordera es denominada **conductiva**; si hay lesión en el oído interno, **neurosensorial**; si hay una combinación de las dos anteriores, **mixta**, y cuando el origen de la hipoacusia está en las vías auditivas superiores, se habla de una hipoacusia **central**.
- Edad de aparición: la hipoacusia es **prelocutiva** cuando se manifiesta antes de la adquisición del lenguaje. Dentro de este grupo, las congénitas son aquellas que están presentes en recién nacidos. La hipoacusia es **postlocutiva** cuando se presenta una vez adquirido el lenguaje.
- Frecuencias afectadas: pueden estar afectadas las frecuencias **bajas** (por debajo de 500 hercios (Hz)), las frecuencias **medias** (entre 501-2000 Hz) y las frecuencias **altas** (por encima de 2000 Hz).
- Gravedad: hace referencia al grado de pérdida auditiva, cuantificado como la media para las frecuencias de 0.5, 1, 2 y 4 kilohercios (kHz) en el oído con mejor audición. Atendiendo a este valor, la sordera puede ser **leve**, cuando la pérdida es de entre 20 y 40 decibelios (dB); **moderada**, cuando la pérdida está entre 41 y 70 dB; **grave**, si la pérdida es de entre 71 y 95 dB, y **profunda** cuando supera los 95 dB.
- Progresión: la sordera puede ser **estable**, si no varía en grado con el tiempo; **progresiva**, si el deterioro de la audición es superior a 15 dB (como media para las frecuencias 0.5, 1, 2 kHz) en un periodo de 10 años, o **fluctuante**, cuando el grado de afectación del individuo varía a lo largo del tiempo con periodos de mejoría seguidos de otros de empeoramiento.

- Simetría: la sordera puede ser **unilateral** si afecta sólo a uno de los oídos o **bilateral** si afecta a los dos oídos.
- Alteraciones vestibulares: se presentan como mareos, vértigo, pérdidas de equilibrio, etc, y pueden ir o no acompañando a la sordera.
- Acúfenos: son sonidos que el individuo puede escuchar en ausencia de estimulación y de forma independiente a ésta. Pueden presentarse, en algunos casos, junto con la pérdida auditiva.

Genéticamente, las sorderas hereditarias son muy heterogéneas, aunque en su mayoría están causadas por la alteración de un único gen (monogénicas). Las sorderas no sindrómicas se pueden clasificar según su patrón de herencia en autosómicas recesivas (70-80% del total de sorderas hereditarias), autosómicas dominantes (10-20%), ligadas al cromosoma X (1-2%), ligadas al cromosoma Y (un único caso descrito, Wang y cols. 2004) y de herencia materna o mitocondrial (0-20% según poblaciones) (Tekin y cols. 2001; Morton 2002). La sordera no sindrómica autosómica recesiva es, en general, prelocutiva, casi siempre congénita, neurosensorial, grave o profunda, estable y con afectación de todas las frecuencias. En cambio, la sordera no sindrómica autosómica dominante suele ser postlocutiva, neurosensorial, menos grave en su comienzo pero progresiva en el tiempo y, en algunos casos, con alteración de un intervalo concreto de frecuencias (Petit 1996; Bom y cols. 1999). Sobre este último tipo de sorderas es sobre el que versa este trabajo.

### **3. Genética de las hipoacusias hereditarias no sindrómicas**

La localización e identificación de genes de sordera comenzó en la década de los 90. La estrategia clásica de trabajo que se ha venido utilizando en el estudio genético de las sorderas no sindrómicas ha sido el análisis de ligamiento en casos familiares de hipoacusia. Para que la información resultante del análisis sea concluyente, la familia debe estar compuesta por un número alto de individuos que padezcan el mismo tipo de sordera, distribuidos en varias generaciones. A medida que fueron identificándose más localizaciones, los *loci* se clasificaron y se nombraron de la siguiente forma: a los *loci* con herencia autosómica dominante le corresponden las siglas DFNA, a los de herencia autosómica recesiva, DFNB, a los de herencia ligada al cromosoma X, DFN y a los ligados al cromosoma Y, DFNY. A los acrónimos se les añade un índice numérico que hace referencia al orden en que se han ido identificando. En la actualidad, se han mapeado 43

*loci* DFNA, 59 *loci* DFNB, 4 DFN y 1 DFNY (Van Camp y Smith 2009). Las sorderas debidas a herencia mitocondrial están asociadas a mutaciones en dos genes, el gen del RNA ribosómico 12S (12S rRNA) y el gen del RNA de transferencia para la serina (tRNA<sup>UCN</sup><sub>Ser</sub>). También se han encontrado dos *loci* modificadores que se han denominado DFNM1 y DFNM2. El primero, puede que prevenga la sordera asociada a DFNB26 (Riazuddin y cols. 2000); el segundo parece provocar la sordera en presencia de la mutación A1555G en el gen del 12S rRNA mitocondrial (Bykhovskaya y cols. 2000). De todos los *loci* mapeados, se ha identificado el gen responsable en 51 casos (24 genes DFNB, 16 DFNA, 9 genes que pueden ser DFNA o DFNB y 2 DFN). Estos genes (Tabla 1) codifican proteínas con variedad de funciones, unas conocidas y otras aún por determinar (Petit y cols. 2001; Friedman y Griffith 2003; Finsterer y Fellingner, 2005; Van Camp y Smith 2009). En algunos casos, las diferentes mutaciones en un gen determinado pueden estar asociadas a sorderas con manifestaciones clínicas y patrones hereditarios distintos (por ejemplo *GJB2*, *GJB6* o *TECTA*) e incluso a sorderas sindrómicas (por ejemplo *COL11A2* que está asociado a sordera tipo DFNA13 y al síndrome de Stickler, o el gen *MYO7A* que está asociado a sordera dominante tipo DFNA11, a sordera recesiva tipo DFNB2 y al síndrome de Usher tipo 1B, de herencia recesiva). Además, puede haber varios genes asociados a sordera localizados en un mismo *locus*. Ejemplos de esto son, el *locus* DFNA3/B1 que contiene dos genes, *GJB6* (Conexina 30) y *GJB2* (Conexina 26), y el *locus* DFNA2, en el que se encuentran los genes *KCNQ4* y *GJB3* (Conexina 31) y en el que, se piensa, aún podría haber un tercer gen.

En los últimos años, la investigación en el campo de la genética de las sorderas ha experimentado un gran desarrollo gracias a la disponibilidad de la secuencia del genoma humano y a la identificación de genes que se expresan específicamente (EST: *Expressed Sequence Tag*) en la cóclea, humana y en la de otros organismos como el ratón. Esta especie animal se utiliza como modelo de estudio de las sorderas en humano debido a la gran similitud que guardan las cócleas de ambas especies tanto a nivel anatómico como funcional. La localización de genes relacionados con la audición en ratón ha sido más fructífera que en humano y, hasta el momento, se han identificado más de 200 genes relacionados con la audición. Sólo en algunos casos se ha encontrado y validado el gen ortólogo en humanos.

**Tabla 1. Genes asociados a hipoacusia en humano.**

Gen	Loci	Proteína	Función celular	Papel en oído interno
<i>ACTG1</i>	DFNA20/A26	$\gamma$ - actina	Citoesqueleto	Proteína estructural de las CCs
<i>BSND</i>	DFNB73	Barttina	Canal iónico y chaperona	Control del trafico intracelular
<i>CCDC50</i>	DFNA44	Ymer	Transmisión de señales	Desarrollo del sistema auditivo
<i>CDH23</i>	DFNB12/USH1D	Cadherina 23	Adhesión celular	Formación del penacho de esterocilios
<i>CLDN14</i>	DFNB29	Claudina 14	Uniones estrechas	Delimitación de endolinfa y perilinfa
<i>COCH</i>	DFNA9	Coclina	Matriz extracelular	ND
<i>COL11A2</i>	DFNA13	Colágeno XI $\alpha$ 2	Matriz extracelular	Componente estructural de la MT
<i>COMT2</i>	DFNB63	Metiltransferasa	Degradación de Dopamina	Funcionalidad de las CCs
<i>CRYM</i>	---	$\mu$ - cristalina	Regulador de hormonas	Desarrollo del sistema auditivo
<i>DFNA5</i>	DFNA5	DFNA5	ND	ND
<i>DLAPH1</i>	DFNA1	Diaphanous-1	Citoesqueleto	Interacción con actina en CCs
<i>ESP</i>	DFNB36	Espina	Citoesqueleto	Interacción con actina en CCs
<i>ESRRB</i>	DFNB35	ESRRB	Receptor de estrógenos	Desarrollo del sistema auditivo
<i>EYA4</i>	DFNA10	EYA4	Regulador de la transcripción	Desarrollo del sistema auditivo
<i>GJB2</i>	DFNA3/B1	Conexina 26	Uniones comunicantes	Reciclaje de iones K+
<i>GJB3</i>	DFNA2	Conexina 31	Uniones comunicantes	Reciclaje de iones K+
<i>GJB6</i>	DFNA3/B1	Conexina 30	Uniones comunicantes	Reciclaje de iones K+
<i>HGF</i>	DFNB39	HGF	Factor de crecimiento	ND
<i>KCNQ4</i>	DFNA2	KCNQ4	Canal iónico	Reciclaje de iones K+
<i>LHFPL5</i>	DFNB66/B67	LHFPL5/TMHS	Proteína integral de membrana	ND
<i>LOXHD1</i>	DFNB77	LOXHD1	Proteína integral de membrana	Funcionalidad de las CCs
<i>MARVE</i>	DFNB49	Tricelulina	Proteína integral de membrana	Mantenimiento de los compartimentos.
<i>MTRNR1</i>	---	rRNA 12S	Traducción	Síntesis de proteínas mitocondriales
<i>MTTS1</i>	---	tRNA-Ser(UCN)	Traducción	Síntesis de proteínas mitocondriales
<i>MYH14</i>	DFNA4	Miosina IIc	Citoesqueleto	Motilidad en el penacho de esterocilios
<i>MYH9</i>	DFNA17	Miosina IIa	Citoesqueleto	Motilidad en el penacho de esterocilios
<i>MYO15A</i>	DFNB3	Miosina XVa	Citoesqueleto	Motilidad en el penacho de esterocilios
<i>MYO1A</i>	DFNA48	Miosina Ia	Citoesqueleto	Motilidad en el penacho de esterocilios
<i>MYO3A</i>	DFNB30	Miosina IIIa	Citoesqueleto	Motilidad en el penacho de esterocilios
<i>MYO6</i>	DFNA22/B37	Miosina VI	Citoesqueleto	Motilidad en el penacho de esterocilios
<i>MYO7A</i>	DFNA11/B2/USHB1	Miosina VIIa	Citoesqueleto	Motilidad en el penacho de esterocilios
<i>OTOA</i>	DFNB22	Otoancorina	Matriz extracelular	Anclaje de la MT al epitelio sensorial
<i>OTOF</i>	DFNB9	Otoferlina	Sinapsis	Fusión de vesículas sinápticas en CCI
<i>PCDH15</i>	DFNB23/USH1F	Protocaderina 15	Adhesión celular	Formación del penacho de esterocilios
<i>PJVK</i>	DFNB59	Pejvakina	ND	ND
<i>POU3F4</i>	DFN3	POU3F4	Regulador transcripcional	Desarrollo del sistema auditivo
<i>POU4F3</i>	DFNA15	POU4F3	Regulador transcripcional	Desarrollo del sistema auditivo
<i>PRPS1</i>	DFN2	PRPS1	Síntesis de nucleótidos	ND
<i>RDX</i>	DFNB24	Radixina	Citoesqueleto	Organización interna de los esterocilios
<i>SLC17A8</i>	DFNA25	VGLUT3	Transportador de glutamato	Carga de glutamato en vesículas sinápticas
<i>SLC26A4</i>	DFNB4	Pendrina	Transportador iónico	Homeostasis de la endolinfa
<i>SLC26A5</i>	---	Prestina	Transportador iónico	Electromotilidad en CCEs
<i>STRC</i>	DFNB16	Esterocilina	ND	ND
<i>TECTA</i>	DFNA8/A12/B21	$\alpha$ - tectorina	Matriz extracelular	Componente estructural de la MT
<i>TFCP2L3</i>	DFNA28	TFCP2L3	Regulador transcripcional	Desarrollo del sistema auditivo
<i>TMC1</i>	DFNA36/B7/B11	TMC1	Proteína integral de membrana	ND
<i>TMIE</i>	DFNB6	TMIE	Proteína integral de membrana	ND
<i>TMPRSS3</i>	DFNB8/B10	TMPRSS3	Enzima proteolítica	Homeostasis de la endolinfa
<i>TRIOBP</i>	DFNB28	TRIOBP	Citoesqueleto	Interacción con actina en CCs
<i>USH1C</i>	DFNB18/USH1C	Harmonina	Citoesqueleto	Organización interna de los esterocilios
<i>WFS1</i>	DFNA6/A14/A38	Wolframina	ND	ND
<i>WHRN</i>	DFNB31	Whirlina	Citoesqueleto	Organización interna de los esterocilios

Estos datos, ponen de manifiesto la enorme heterogeneidad genética de este déficit neurosensorial así como la complejidad del proceso auditivo. De hecho, se postula que el 1% de los genes humanos, lo que supone entre 300 y 500 genes, están implicados en el buen funcionamiento del proceso auditivo (Friedman y Griffith, 2003; Finsterer y Fellingner, 2005).

#### **4. Los microRNAs**

Los microRNAs (miRNAs) pertenecen al grupo de los RNAs no codificantes de pequeño tamaño. Dentro de este grupo, además de los miRNAs, se encuentran también otros RNAs como son los siRNAs (RNAs de interferencia) y los piRNA (RNAs asociados a proteínas PIWI). Todos ellos tienen en común el papel regulador que ejercen sobre la expresión génica y participan en gran multitud de procesos biológicos desde el desarrollo y diferenciación de tejidos y órganos (Nilsen 2007) hasta la defensa del genoma del material genético exógeno como el proveniente de virus, transposones y transgenes (Carthew y Sontheimer 2009). Estos reguladores están ampliamente distribuidos entre los eucariotas pluricelulares. A continuación se dan algunas claves sobre la biogénesis y mecanismos de acción de los miRNAs.

##### **4.1. Introducción histórica**

Los miRNAs son RNAs no codificantes de unas 20 a 25 pares de bases (pb) que participan en la regulación de una gran variedad de procesos tales como el patrón temporal en el desarrollo, control del crecimiento o la diferenciación celular y la organogénesis (Nilsen 2007). El primer regulador, lin-4, y su correspondiente diana, lin-14, fueron descritos en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Lee y cols. 1993 y Wightman y cols. 1993), aunque no fue hasta el 2000 cuando los miRNAs comenzaron a cobrar importancia gracias al trabajo de Reinhart y colaboradores sobre la clonación del gen let-7 (Reinhart y cols. 2000).

Poco después, varios laboratorios publicaron a la vez estudios en los que se describía el hallazgo de cientos de genes similares a lin-4 y let-7 conservados evolutivamente desde nematodos a mamíferos (Lagos-Quintana y cols. 2001; Lau y cols. 2001; Lee y Ambros 2001; Lagos-Quintana y cols. 2003; Nielson y Sharp 2008). A partir de ese momento el número de genes y de publicaciones sobre los miRNAs no ha dejado de crecer. La



conservación a lo largo de la evolución de muchos de ellos refleja la gran importancia de estos reguladores para las funciones celulares más básicas (Ivan 2008).

#### 4.2. Genes y biogénesis

En los últimos años se han clonado y predicho muchos genes que dan lugar a microRNAs en diferentes organismos. En el genoma humano, por ejemplo, se cree que están codificados más de 1000 miRNAs, lo que supone el 3% del total de genes. Los criterios utilizados para identificar estos genes mediante métodos experimentales e informáticos han tenido en cuenta el nivel de expresión del miRNA y las características moleculares necesarias en el proceso de biogénesis: los miRNAs maduros han de tener una expresión detectable, su secuencia completa debe estar incluida dentro de una molécula de RNA más larga o precursora (pre-miRNA) que, además, debe tener una estructura secundaria característica de tallo-lazo en la que el miRNA maduro ocupe la parte del tallo (Ambros y cols. 2003 revisado en Berezikov y cols. 2006 y Zeng 2006). De esta forma, se han encontrado genes que codifican miRNAs localizados en regiones intergénicas, en regiones UT (5' o 3') y en intrones de otros genes. A estos últimos se los denomina mirtrones y suponen alrededor del 50% de los miRNAs en mamíferos (Rodríguez y cols. 2004 revisado en Zeng 2006). En general, los genes de los miRNAs pueden transcribirse como parte del gen en el que se alojan o como unidades transcripcionales independientes con promotor propio, mono o policistrónicas, en las que varios genes de diferentes miRNAs se transcriben juntos en una misma molécula de RNA primaria (pri-miRNA) que puede tener una longitud de varias kilobases. La enzima encargada de la transcripción es generalmente la RNA polimerasa II dando lugar a un pri-miRNA que presenta en 5' una protección de 7-metilguanilato (m7G) y en 3', una cola de poliadenosinas (poli A). En algunos casos particulares la transcripción es llevada a cabo por la RNA polimerasa III.

##### 4.2.1 Etapa nuclear: desde el pri-miRNA al pre-miRNA

El pri-miRNA tiene una longitud mucho mayor que el miRNA maduro y por tanto ha de sufrir un proceso de maduración. La primera etapa del procesamiento del pri-miRNA la lleva a cabo un complejo macroproteico nuclear denominado microprocesador, que reconoce la estructura en tallo-lazo y las regiones de cadena simple adyacentes del pri-miRNA. La proteína Drosha, junto con DGCR8 (*Di George Síndrome Critical Region Gen 8*), proporciona a este complejo la actividad RNasaIII y es la encargada de escindir la estructura de tallo-lazo (pre-miRNA) del resto del pri-miRNA (Fig. 2). Como resultado del

procesamiento de Drosha, la molécula pre-miRNA, de alrededor de 70 bases de longitud, presenta un grupo fosfato en 5' y dos nucleótidos protuberantes en 3', que serán necesarios para la exportación al citoplasma y las siguientes etapas del procesamiento. En el caso de los mirtrones, puede ser la maquinaria de maduración de los mRNAs o el microprocesador el que libere los pre-miRNAs del intrón que los contiene.

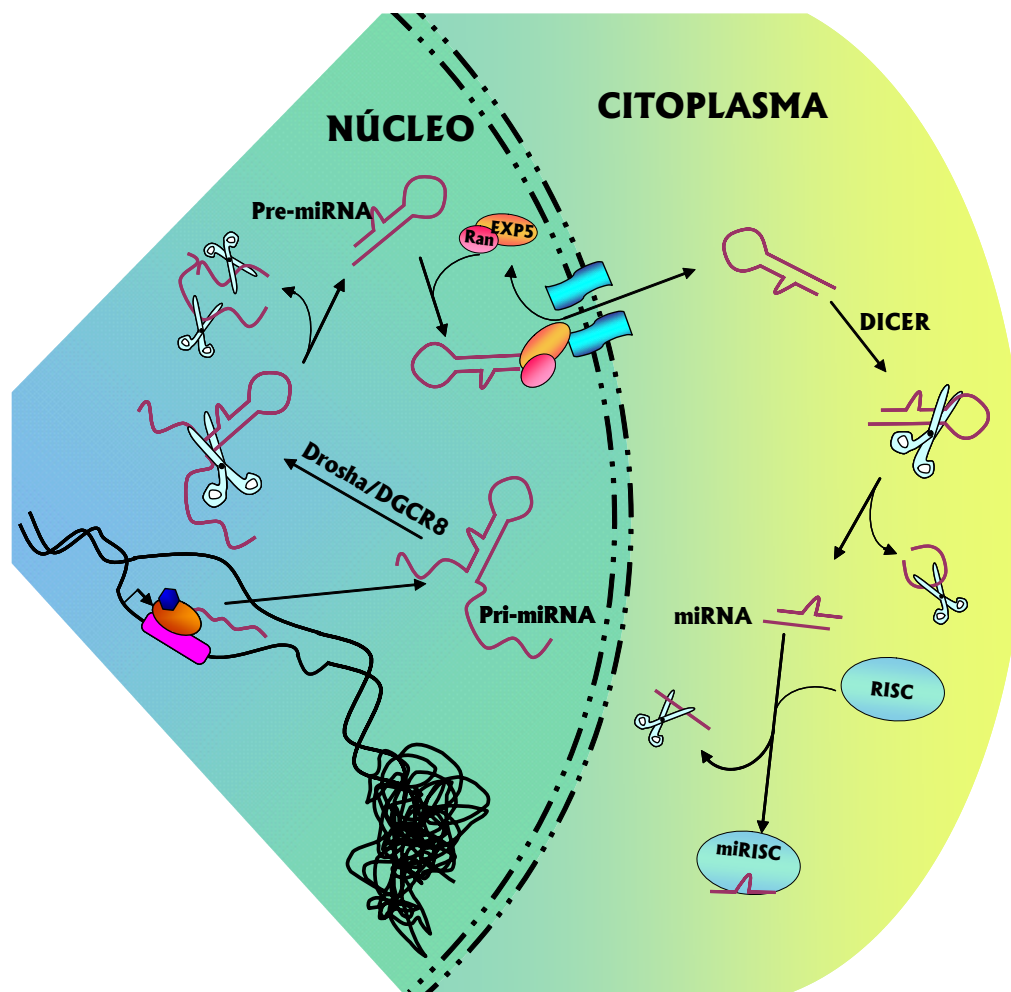


Figura 2. Esquema de la biogénesis de los miRNAs. Se distinguen tres etapas: la etapa nuclear, en la que el gen que codifica el miRNA es transcrito por la polimerasa y el pri-miRNA resultante, es procesado por el complejo microprocesador (Drosha/ DGCR8), dando lugar al pre-miRNA; la etapa de exportación del pre-miRNA al citoplasma, mediada por el complejo exportina 5/Ran (EXP5/Ran), y la etapa citoplasmática en la que el pre-miRNA es procesado por Dicer alcanzando la madurez funcional y el miRNA es cargado en el complejo efector del silenciamiento RISC para formar el miRISC.

#### 4.2.2. Etapa citoplasmática: desde el pre-miRNA hasta el miRNA maduro

Los precursores han de salir del núcleo para continuar su maduración. El proceso de transporte de los precursores desde el núcleo es dependiente de GTP y está mediado por la exportina 5/ GTPasa Ran (*Ras-related Nuclear protein*) (Exp-5/Ran). Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es procesado de nuevo hasta convertirlo en el miRNA maduro y activo. El complejo multiproteico responsable de esta etapa cuenta con una subunidad con actividad RNasaIII denominada Dicer que corta el pre-miRNA a una distancia determinada del extremo y libera un dúplex de RNA de unos 20 pb (Fig. 2). Puesto que es una RNasaIII, también deja dos nucleótidos protuberantes en 3' y un grupo fosfato en 5'.

#### 4.2.3. Formación del complejo ribonucleoproteico efector miRISC

El dúplex obtenido tiene una vida media muy corta ya que el proceso de corte del pre-miRNA y la unión de una de las hebras a otro de los componentes del complejo, la proteína Ago-2, están físicamente acoplados. La proteína Ago-2 pertenece a una familia de proteínas denominadas Argonautas. Todos los miembros de la familia participan en procesos de silenciamiento mediados por siRNAs y miRNAs. En humano, es Ago-2 la que une ambos tipos de RNA. La hebra con la que interacciona es la que tiene en el extremo 5' el apareamiento de bases termodinámicamente menos estable (miRNA) (Fig. 2). La otra cadena (miRNA\*) va a ser desechada aunque, en ocasiones, también puede ser unida por la proteína Ago-2. Con la unión del miRNA maduro queda completo el complejo ribonucleoproteico que será capaz de interactuar con los mRNAs codificantes e impedir su traducción. Este complejo recibe el nombre de miRISC (*miRNA- Inducing Silencing Complex*). Además de Dicer, Ago-2 y el miRNA, el miRISC también se une a otras proteínas. Una de ellas, la proteína GW182 se asocia a Ago-2 y es necesaria para que el silenciamiento mediado por el miRNA tenga lugar (Zeng 2006; Engels y Hutvagner 2006; Lau y MacRae 2009; Carthew y Sontheimer 2009).

#### 4.3. Reconocimiento de los mRNAs diana y mecanismos de acción de los miRNAs

El miRNA funciona como un adaptador que permite al miRISC reconocer un mRNA en particular y bloquear su traducción. La secuencia determinante de la especificidad en la interacción entre el miRNA y sus dianas recibe el nombre de región *seed*. Esta región abarca siete bases, posiciones 2 a 8, en su extremo 5'. Las secuencias diana que reconocen los miRNAs se caracterizan por presentar una perfecta complementaridad con la región *seed* y suelen situarse en la región 3'UT de los mRNAs. Para que la diana sea accesible al complejo de silenciamiento debe situarse dentro de una

región rica en nucleótidos AU y a una distancia de más de 15 bases del codón de parada. Cuando la región 3'UT del mensajero tiene una gran longitud, las dianas deben localizarse fuera de la zona media de dicha región para que el miRISC pueda interaccionar con ellas (Bartel 2009).

Una vez que el mRNA ha sido reconocido por el miRISC, puede seguir diferentes rutas (Fig. 3). Puede ocurrir que la secuencia diana (22 nucleótidos) sea totalmente complementaria al miRNA. En este caso, la actividad RNasa que tiene la proteína Ago-2 se activa y el mRNA es degradado (Fig. 3). Este es mecanismo de acción común de los siRNAs pero no de los miRNAs. En general, el apareamiento entre el miRNA y su diana no es completo, existen regiones en las que no hay complementariedad de bases, lo que impide la activación de la función RNasa y la degradación directa del mRNA diana.

### 4.3.1. Mecanismos de represión de la traducción mediados por miRNA

1.- Inhibición directa del inicio de la traducción. Existen varios modelos que apoyan esta forma de regulación aunque ninguno de ellos es universal. Se ha visto que el miRISC puede interferir en el acoplamiento del complejo de iniciación, compitiendo con las proteínas que lo forman para unirse a la caperuza protectora en 5'. Si esto fuera así, los miRNAs no tendrían efecto represor sobre la expresión de mRNAs que contienen un sitio interno de unión de ribosomas (IRES). Sin embargo, se han encontrado casos en los que sí hay represión. Por tanto, el complejo miRISC debe actuar también en otras fases del proceso (Zeng 2006).

2.- Degradación de los péptidos nacientes. Los mRNAs que se están traduciendo activamente, esto es, unidos a varios ribosomas (polisoma), pueden, a su vez, estar interaccionando con el complejo miRISC. En estos casos la proteína no se detecta porque los péptidos que van surgiendo son degradados según se van formando.

3.- Separación prematura de los ribosomas y el mRNA. Los ribosomas que están traduciendo el mRNA pierden afinidad por el mismo antes de llegar al codón de parada por lo que no habría proteína completa.

Cualquiera de los modelos descritos (Fig. 3) supone que no hay variaciones en la cantidad de mRNA, simplemente no se traduce. En realidad, esto no es siempre así. En ocasiones se produce la desestabilización y degradación del mRNA. El número, el tipo y la posición de los puntos de no apareamiento entre el miRNA y la diana parecen ser los que marcan el destino que sigue el mRNA (Aleman y cols. 2007 revisado en Carthew y Sontheimer 2009).

La intensidad de la regulación va a depender del número y el tipo de dianas presentes en el mRNA: una única diana para un miRNA en concreto, supondría un efecto suave sobre la traducción y varias dianas, para un miRNA en concreto o para diferentes miRNAs, conllevaría la inhibición total de la traducción (Kloosterman y Plasterk 2006).

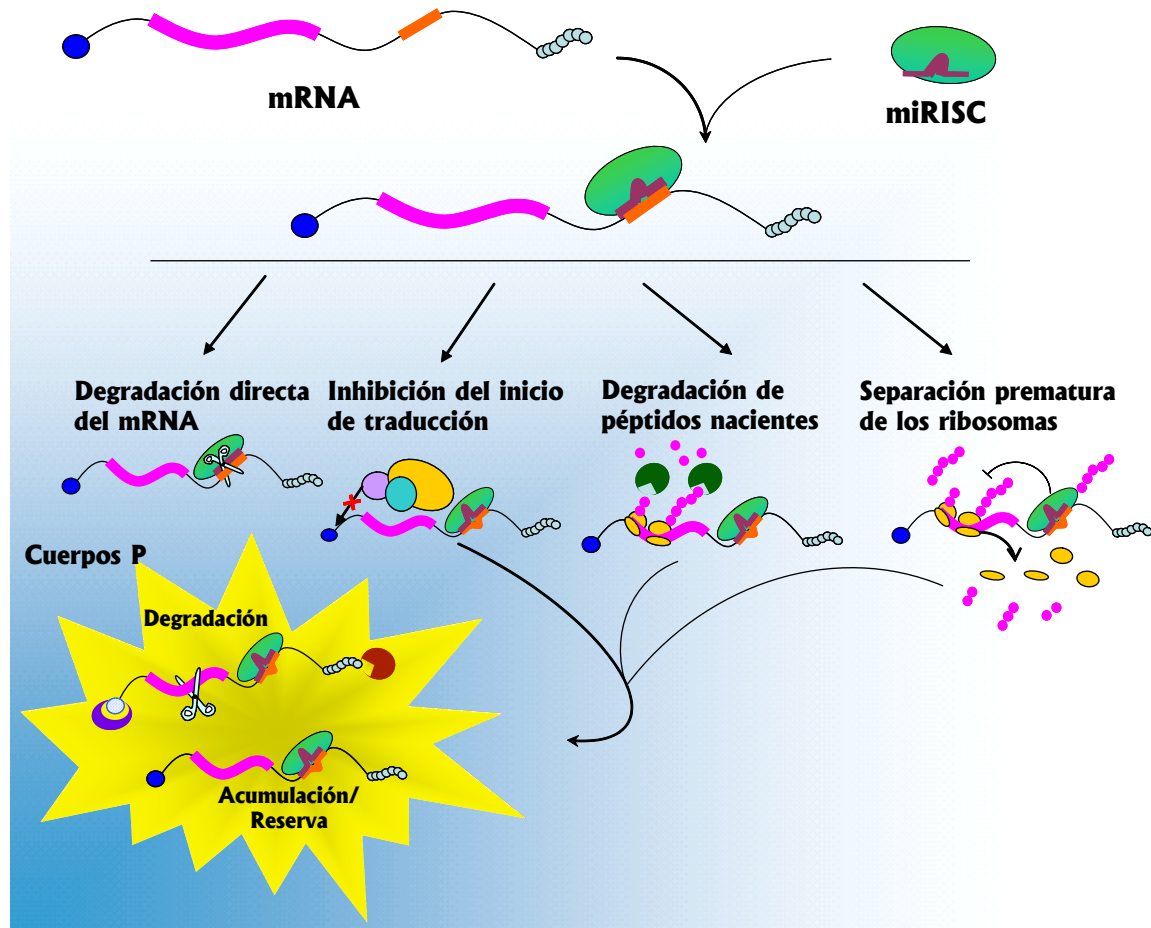


Figura 3. Posibles mecanismos de acción del miRNA sobre la traducción del mRNA diana.

#### 4.3.2. Localización subcelular del proceso de silenciamiento

Se piensa que el proceso de regulación de la traducción dependiente de miRNA podría llevarse a cabo en unas estructuras citoplasmáticas llamadas cuerpos de procesamiento (cuerpos P o *p-bodies* en inglés) o cuerpos GW debido a que en ellos son abundantes las proteínas de la familia GW, que se caracterizan por tener múltiples repeticiones glicina (G) triptófano (W) (Eulalio, Tritschler y Izaurralde 2009). La proteína GW182, miembro de esta familia, forma parte del miRISC donde interacciona con Ago-2. Los cuerpos P han sido imposibles de purificar hasta el momento, por lo que se conoce poco sobre su composición. Lo que se sabe es que en ellos no hay ribosomas pero sí se acumulan componentes del miRISC tales como miRNAs y proteínas como Ago-2 y Dicer.

También están presentes aquellos complejos enzimáticos implicados en la desestabilización y degradación de los mRNAs. Uno de los modelos propuestos considera que la interacción del miRISC con el mRNA diana sería transitoria: el complejo de silenciamiento se uniría al mRNA, detendría o impediría la traducción y la proteína GW182, interaccionando con Ago-2, conduciría al mRNA-miRISC a un cuerpo P, donde el miRISC liberaría al mRNA. Allí, éste sería eliminado o retenido hasta el momento en que fuera necesaria su traducción (Fig. 3) (Nilsen 2007; Carthew y Sontheimer 2009).

#### 4.4. miRNAs y enfermedad. Mecanismos patogénicos.

Los mecanismos patogénicos descritos hasta ahora se pueden resumir en los siguientes:

- Desregulación cuantitativa de un miRNA. Este tipo de defectos se dan en cáncer; la disminución de algunos miRNAs que funcionan como oncosupresores como el cluster let-7/miR-98 y el aumento de otros que actúan como miRNAs oncogénicos (oncomirs) suprimiendo la expresión de dianas con actividad oncoprotectora, como el miR-21 o el miR-155 se ha descrito en gran variedad de tumores sólidos y en cánceres hematológicos (Wang y Lee 2009).
- Mutaciones en la región 3'UT de un mRNA:
  - Variación de la eficacia del silenciamiento. En el gen *SLITRK1* asociado al síndrome de Tourette (MIM: #137580) se ha encontrado, en dos casos independientes, una mutación que altera la secuencia de la diana para el miR-189 situada en su región 3'UT. La alteración de la secuencia diana se traduce en un aumento de la eficacia de la actividad represora del miR-189 sobre la traducción del mRNA codificado por dicho gen. Esto supondría que los miRNAs podrían estar implicados en las rutas bioquímicas que subyacen a este síndrome (Kloosterman y Plasterk 2006; Soifer, Rosi y Sætrom 2007).
  - Desaparición de dianas. En la paraplejia espástica hereditaria, patología que se hereda según un patrón autosómico dominante, se han encontrado al menos dos mutaciones en la región 3'UT del gen *REEPI* que alteran la secuencia que reconoce el miR-140, que segregan con la enfermedad y no aparecen en controles. Hasta el momento no se han realizado pruebas funcionales que demuestren la patogenicidad de estas mutaciones (Beetz y cols. 2008 revisado en Garzon y cols. 2009).

- Aparición de nuevas dianas. La mutación encontrada en el gen de la miostatina (GDF8) da lugar a la aparición de una diana para miR-1 y miR-206. La consecuencia es una regulación inapropiada de la miostatina que se traduce en hipertrofia muscular (Kloosterman y Plasterk 2006, Catalucci, Latronico y Condorelli 2008).
- Mutaciones que cambian la secuencia del miRNA. Cambios que alteren la región *seed*, es de suponer que alteren la funcionalidad del miRNA. Hasta el momento no se han encontrado variaciones en la secuencia de un miRNA que estén directamente implicadas en el desarrollo de una enfermedad hereditaria.

#### 4.5. miRNAs en el oído interno de mamíferos

Los miRNAs que se expresan en el oído interno de mamíferos participan activamente en la regulación de diferentes procesos de su desarrollo como la neurogénesis y la innervación, el desarrollo epitelial o la diferenciación de las células ciliadas. En el oído interno del ratón recién nacido (P0) se detectan más de 100 miRNAs diferentes (Weston y cols. 2006). El patrón de expresión de estos miRNAs no sufre variaciones importantes durante la maduración del oído y se mantiene una vez adquirida la función auditiva, lo que ocurre en torno a P20. Se muestra también en el trabajo de Weston y colaboradores que ciertos miRNAs se hallan específicamente en un tejido o un grupo de células. Esto supone que esos miRNAs en concreto, van a ser importantes en el desarrollo, diferenciación y/o mantenimiento de ese tipo de célula o tejido. Por ejemplo, los miRNAs de la familia del miR-200 son determinantes en la pérdida de las características mesenquimáticas y la adquisición de las características epiteliales previas a la diferenciación de las células sensoriales, esto es, las células ciliadas. El miR-124 también resulta imprescindible en el desarrollo, diferenciación de las células neuronales y en la migración de las fibras nerviosas que llegan al oído interno (Soukup 2009). Otro grupo de miRNAs que parece tener funciones muy importantes en la diferenciación y la función del oído interno es el compuesto por los miembros de la familia miR-183 (miR-183, miR-96 y miR-182) que se transcriben juntos en una única molécula primaria (Xu y cols. 2007) y son específicos de células sensoriales. En ratón los miembros de este grupo de miRNAs se expresan en células ciliadas y neuronas sensoriales tanto del vestíbulo como de la cóclea (Weston y cols. 2006) y en los fotorreceptores, las células bipolares y las células amacrinas de la retina (Xu y cols. 2007). Los tres miembros de la familia están evolutivamente muy conservados (Pierce y cols. 2008) ya que además de en ratón, se han localizado en células

ciliadas de los órganos sensoriales del el pez cebra (Wienholds y cols. 2005). La conservación evolutiva y la expresión en células sensoriales hacen pensar que miR-183, miR-96 y miR-182 van a tener gran importancia en el desarrollo y la diferenciación del oído interno.



## **OBJETIVOS**



**OBJETIVOS**

La familia S403 fue remitida por el Hospital Universitario de Valladolid en el año 2000 por presentar un historial de sordera neurosensorial que se heredaba según un patrón autosómico dominante. La estructura de la familia y el número de familiares hipoacúsicos y normoyentes que participaron en el estudio nos permitió proponernos los siguientes objetivos:

- 1) Estudio de ligamiento mediante el que se pretende localizar en el genoma la región mínima que segrega con la sordera en la familia.
- 2) Estudio de los genes candidatos de la región crítica con el fin de encontrar la mutación responsable de la sordera en la familia en estudio.
- 3) Búsqueda de otras mutaciones en el gen validado en otras familias no diagnosticadas de la colección del laboratorio mediante un método de despistaje masivo como es el DHPLC.
- 4) Análisis funcionales y estudio del mecanismo de patogénesis asociado a las mutaciones identificadas.



## **PACIENTES Y MÉTODOS**



## **PACIENTES Y MÉTODOS**

### **1. Pacientes**

La familia S403 fue remitida a nuestro laboratorio desde el Hospital Universitario de Valladolid por presentar un historial de sordera hereditaria. Esta familia consta de cinco generaciones y la componen 74 miembros, 37 de los cuales padecen hipoacusia. Para este estudio se consiguió la participación de un total de 55 familiares.

La familia S1334 con 3 de sus 8 miembros afectados de sordera hereditaria, nos fue enviada desde el Hospital Universitario Gregorio Marañón de Madrid.

De cada participante se obtuvo el consentimiento informado y una muestra de sangre de la que se extrajo el DNA por el método salino (Millers and cols. 1988). Además, todos ellos fueron sometidos a una exploración clínica para descartar los factores ambientales como causa de la sordera y para confirmar la ausencia de cualquier anomalía sindrómica. El estudio auditivo consistió en una timpanometría con medida del reflejo acústico para valorar el funcionamiento del oído medio, y en una audiometría tonal liminal para medir la conducción por vía aérea (250-8000Hz) y por vía ósea (500-4000Hz). También, y siempre que fue posible, se recopilaron los audiogramas previos de los pacientes. En el caso de los sujetos II:2 y III:1 de la familia S1334 el estudio se completó con pruebas de imagen (TAC, Tomografía Axial Computerizada, y Resonancia Magnética Nuclear) para descartar la presencia de malformaciones del oído interno, y una revisión oftalmológica que consistió en un test de fluoresceína en ambos ojos, fondo de ojos y un estudio de campo visual completo, para descartar problemas oculares.

### **2. Estudio genético molecular de la familia S403**

#### **2.1. Genotipado**

Con el fin de localizar la región cromosómica asociada al déficit auditivo en la familia S403, se realizó un análisis a genoma completo con 394 marcadores polimórficos tipo microsatélite, distribuidos por todos los cromosomas a una distancia promedio equivalente a 10 cM, que fueron tomados del panel de microsatélites ABI Prism Linkage Mapping Set 2 (Applied Biosystem). Los marcadores utilizados para la exclusión de *loci* conocidos y para el refinamiento del nuevo intervalo crítico se eligieron de entre los disponibles en los mapas genéticos del cromosoma 7, Marshfield (Center for Medical Genetics) y Généthon (Dib y cols. 1996). Además, mediante inspección ocular de la secuencia pública disponible de la región (GeneBank, NCBI) se localizó una repetición

dinucleotídica, GT en tándem, en el intervalo antes mencionado. Tras confirmar experimentalmente que esta repetición correspondía a un microsatélite polimórfico, se depositó su secuencia en la base de datos GDB (*Genome Data Bank*) con el nombre de D7S3304 (GDB:11511396). El orden de los marcadores se estableció mediante la integración del mapa físico de STSs (*Sequence Tagged Site*) (MapView, NCBI) y los mapas genéticos del cromosoma 7.

Los marcadores microsatélite se amplificaron en cada individuo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para lo que se utilizaron oligonucleótidos (uno por pareja) conjugados en 5' con una de estas tres moléculas fluorescentes: TET, FAM o HEX (Roche). En la mezcla de reacción de PCR se añadieron: 10 pmoles de cada oligo, 1.5 µl de tampón de reacción 10X, 2.5 nmoles de dNTPs, 0.75 U de polimerasa (Fast Start, Roche), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 20 ng de DNA genómico, todo ello en un volumen de 15 µl. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Geneamp 9700 (Applied Biosystem) empleando el siguiente programa:

- 94 °C 5 min.
- (94 °C 40 s, 56 °C 40 s) x 35 ciclos.
- 72 °C 5 min.

Los amplificados fluorescentes se desnaturalizaron en formamida y se sometieron a electroforesis capilar en un analizador automático de DNA ABI PRISM™ 310 (Applied Biosystem). Mediante el programa GeneScan (Applied Biosystem) se analizó cada muestra y se calculó la longitud de los alelos amplificados en cada caso.

## 2.2. Análisis de ligamiento

Una vez obtenido el valor de los alelos de cada individuo (genotipo) para cada marcador, se realizó un análisis de ligamiento a dos puntos para determinar si el *locus* de la sordera estaba genéticamente ligado a alguno de dichos marcadores y así, mapear el gen asociado. La idea de ligamiento genético se apoya en el concepto de fracción de recombinación ( $\theta$ ) que se define como la probabilidad de que, durante la meiosis, ocurra una recombinación entre dos *loci* dados. La fracción de recombinación se utiliza como una medida de distancia genética entre esos dos *loci*: cuanto mayor sea la distancia que los separe, mayor será la fracción de recombinación entre ellos. La unidad de medida de distancia genética es el centiMorgan (cM). Si dos *loci* se encuentran a 1 cM, quiere decir que se produce una única recombinación entre esas dos localizaciones cromosómicas cada 100 meiosis (1%) o lo que es lo mismo, que la fracción de recombinación entre ellos es de



0.01. El valor máximo de  $\theta$  es 0.5 lo que supone que los *loci* estudiados están lo suficientemente alejados para que la probabilidad de heredarse juntos sea al azar (50%).

En las familias grandes, el análisis de ligamiento se lleva a cabo mediante algoritmos matemáticos que calculan la probabilidad de ligamiento en función de la fracción de recombinación, para un genotipo dado. El resultado se muestra en forma de *LOD score* (Z), que de manera resumida se podría definir como:

$$Z = \log_{10} \frac{\text{probabilidad de ligamiento } (\theta)}{\text{probabilidad de no ligamiento}}$$

En general, se acepta que existe ligamiento cuando  $Z \geq +3$  y que no lo hay (exclusión del ligamiento) cuando  $Z \leq -2$ . Para valores de Z entre -2 y +3 no se puede concluir de manera fiable si hay ligamiento o exclusión. El valor máximo de Z ( $Z_{\text{MAX}}$ ) se alcanza cuando  $\theta=0$  si entre el *locus* de interés y el marcador no ha habido recombinaciones. Si las ha habido,  $Z_{\text{MAX}}$  se alcanza a la fracción de recombinación más probable, según la distancia genética que los separe.

El análisis de ligamiento de la familia S403 se realizó utilizando el paquete informático LINKAGE 5.1 (Lathrop y cols. 1985), y dentro de éste, el programa MLINK que calcula el valor de *LOD score* (Z) en función de la fracción de recombinación. Otro de los programas, ILINK, fue utilizado para calcular los valores de  $Z_{\text{MAX}}$  (*LOD score* máximo) y  $\theta_{\text{MAX}}$  (fracción de recombinación para  $Z_{\text{MAX}}$ ). Se calcularon los valores de *LOD score* a dos puntos entre el *locus* de la sordera en la familia y cada uno de los marcadores, definiendo un patrón de herencia autosómico dominante, penetrancia completa, frecuencia del alelo de enfermedad igual a 0.00001 y frecuencias iguales para todos los marcadores.

## 2.3. Análisis de genes candidatos

### 2.3.1. Amplificación por PCR

Se diseñaron oligonucleótidos con ayuda del programa informático OLIGO 4.0, para amplificar por PCR los exones y las regiones intrónicas adyacentes de los genes seleccionados (tabla en el anexo 1). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystem) según el siguiente programa que llamaremos 150TD:

- 96 °C 5 min.
- (96 °C 30 s, 68 °C-63 °C 15 s, 72 °C 30 – 60 s.) x 5 ciclos (la temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos disminuye 1 °C en cada ciclo).
- (96 °C 30 s, 63 °C 15 s, 72 °C 30 – 60 s.) x 30 ciclos.
- 72 °C 5 min.

Se amplificó cada fragmento en dos individuos de la familia, uno normoyente y otro con hipoacusia. Los productos de PCR se comprobaron mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) en tampón TBE (Tris Borato EDTA) 1X y fueron teñidos con bromuro de etidio (ETBr).

### 2.3.2. Secuenciación directa

Los oligonucleótidos remanentes de las reacciones de PCR se eliminaron mediante dos métodos alternativos: a) purificación mediante columna (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN); b) tratamiento con Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina (ExoSAP-IT<sup>®</sup> USB Corporation). Se mezclaron 2 µl de los amplificados con 2 µl de *Big Dye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystem) y 10 pmoles de oligonucleótido en un volumen final de 20 µl. La reacción de secuencia se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystem) según el siguiente método:

- 94 °C 3 min.
- (96 °C 10 s, 50 °C 5 s, 60 °C 4 min) 25 ciclos.

Los productos de reacción se precipitaron en una mezcla de acetato sódico 3M pH 4.6, etanol absoluto y agua, se lavaron con etanol al 70% (v/v) y se secaron en un concentrador a vacío. El análisis de las secuencias se llevó a cabo en un analizador ABI Prism 3100 (Applied Biosystem).

## **3. Búsqueda de mutaciones en los genes *MIRN182*, *MIRN183* y *MIRN96***

### **3.1. Búsqueda de mutaciones por DHPLC**

Se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los genes *MIRN96*, *MIRN183* y *MIRN182* (Tabla 2). La PCR se llevó a cabo según el programa 150TD (ver apartado 2.3.1).

Para detectar la presencia de mutaciones en los productos de PCR, se utilizó la técnica de DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*). Esta técnica permite la detección de cambios puntuales y microdeleciones/inserciones a nivel de DNA en individuos heterocigotos. Previamente al desarrollo de la cromatografía, los productos de amplificación a analizar, son sometidos a un ciclo de desnaturalización seguido de uno

de renaturalización en el que la temperatura va disminuyendo lentamente. Con esto se consigue que se formen dos tipos de dobles hélices: los homodúplex, en los que ambas hebras son totalmente complementarias, y los heterodúplex, en los que las hebras no son totalmente complementarias y por tanto, no están completamente apareadas. Las regiones de desapareamiento entre las cadenas, hacen que el heterodúplex sea térmicamente más inestable que el homodúplex. Las muestras, una vez formados los heterodúplex, se mezclan con un disolvente anfipático, acetato de trietilamonio (TEAA), que actúa de puente entre las moléculas y el polímero inerte que constituye la columna, por la que se hacen pasar las muestras a una temperatura determinada. Dicha temperatura está calculada para conseguir una desnaturalización parcial del fragmento a analizar. Las moléculas adheridas a la columna son separadas de ella mediante un gradiente TEAA: acetonitrilo en el que la concentración de este último va aumentando. Debido a que la doble hélice en los heterodúplex va a tener un mayor porcentaje de bases desapareadas, éstos van a ser liberados antes que los homodúplex. A la salida de la columna, las moléculas son detectadas por un espectrofotómetro que mide la Absorbancia a una longitud de onda de 266 nanómetros (nm). Los datos de Absorbancia se representan en función del tiempo obteniendo así, el cromatograma o perfil de desorción de cada muestra. El perfil gráfico de las muestras con mutaciones en heterocigosis difiere de aquellas en las que no hay cambios o éstos se encuentran en homocigosis.

**Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes *MIRN96*, *MIRN183* y *MIRN182*.**

Gen	Oligonucleótido directo (5'→3')	Oligonucleótido reverso (5'→3')
<b><i>MIRN96</i></b>	GAGGCCTTGAGGAGGAGCAG	GGCCTCCGAGCACCTTAC
<b><i>MIRN183</i></b>	CGACGTCTAGGAGCACTCAAGG	GGGGGGTAGAGACCGTAGCAG
<b><i>MIRN182</i></b>	CTCACTCCTCGATTCAGACTCCAG	GAAGGACCTTGTCGCAGTTGC

Los productos de la PCR (ver apartado 2.3.1) se desnaturalizaron a 96 °C durante 5 minutos y, a continuación, se dejaron enfriar lentamente disminuyendo la temperatura mediante una rampa de un 1%, hasta llegar a los 40 °C, en un termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystem). Las condiciones en las que se desarrolló la técnica se eligieron tras el análisis de cada amplímero con el programa informático WAVEMAKER (Tansgenomics): el inicio y el final del gradiente y la temperatura de carrera para cada fragmento se reflejan en la tabla 3; el flujo de salida de la columna se fijó en 0.9 mL/min.

**Tabla 3. Condiciones para el análisis por DHPLC de los amplicones miR-96, miR-182 y miR-183.**

Amplicón	T <sup>a</sup>	Inicio del gradiente		Final del gradiente	
		%Tampón A	%Tampón B	%Tampón A	%Tampón B
<b>miR-96</b>	63.4°C	45.7	54.3	36.7	63.3
<b>miR-182</b>	62.4°C	41.5	58.5	32.5	67.5
<b>miR-183</b>	61.6°C	45.8	54.2	36.8	63.3

T<sup>a</sup>: Temperatura a la que se desarrolla la cromatografía en cada caso. Composición de los tampones: Tampón A: 0.1 M TEAA pH 7 y Tampón B: 0.1 M TEAA pH 7 / 25% Acetonitrilo (Transgenomics).

Se inyectaron 3 µl de cada amplificado en un equipo Transgenomic WAVE<sup>TM</sup> (Transgenomic). Tras analizar los perfiles cromatográficos se secuenciaron todas aquellas muestras que presentaban perfiles distintos del silvestre. También se secuenciaron varias muestras con perfil silvestre para comprobar la bondad de la técnica.

### 3.2. Detección de las mutaciones miR-96 +13G>A y miR-96+14C>A en el gen *MIRN96*

Para detectar específicamente las mutaciones miR-96+13G>A y miR-96+14C>A, se diseñaron dos ensayos basados en PCR y restricción. Para amplificar sobre DNA genómico un fragmento de 161 pb se utilizaron, un oligonucleótido directo conjugado con un fluoróforo FAM o TET (Roche) y un oligonucleótido reverso, modificado de tal forma que la presencia de la mutación generara una diana para la enzima TaqI en el amplificado (ver figuras 4 y 5). La digestión con TaqI (Roche) dio lugar a dos fragmentos de 141 pb y 20 pb en el caso del alelo miR-96+13G>A, y de 140 pb y 21 pb en el caso del alelo miR-96+14C>A; el alelo silvestre se mantuvo intacto. En ambos ensayos, se detectaron dos fragmentos fluorescentes: el amplificado silvestre intacto, en todos los casos, y el producto de digestión del alelo mutado, de menor tamaño, en los sujetos portadores en heterocigosis de alguna de las mutaciones. El análisis de los productos de digestión se llevó a cabo en un analizador ABI Prism 3100 (Applied Biosystem) mediante el programa informático GeneScan (Applied Biosystem).



Figura 4. Diseño del ensayo de restricción para detectar la mutación miR-96+13G>A en el gen *MIRN96*.

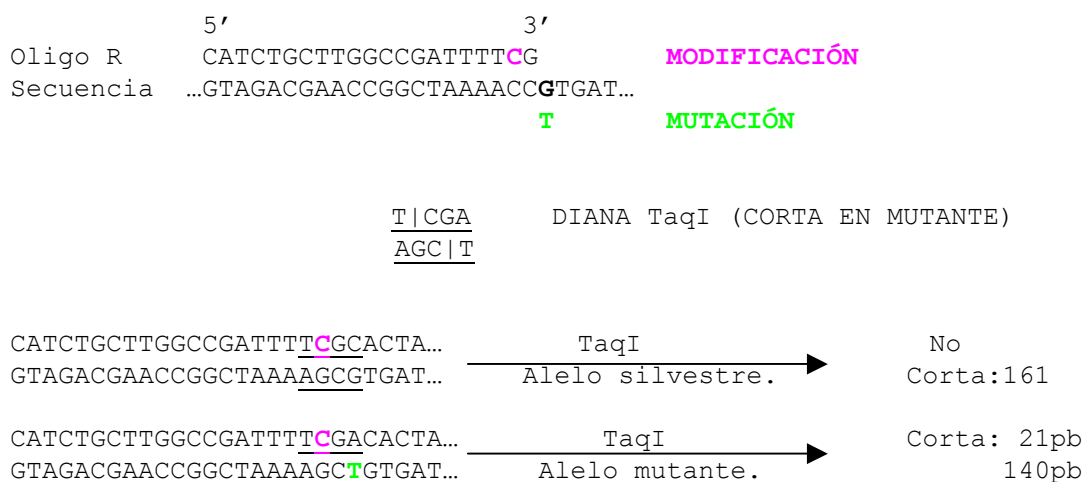


Figura 5. Diseño del ensayo de restricción para detectar la mutación miR-96 +14C>A en el gen *MIRN96*.

#### 4. Análisis de la biogénesis del hsa-miR-96

##### 4.1 Generación de vectores de expresión del miR-96 primario (pri-miR-96) silvestre y sus variantes alélicas miR-96+13G>A y miR-96 +14C>A

A fin de estudiar si las mutaciones afectan a alguna de las etapas de la producción del miR-96 maduro, se construyeron vectores para expresar el pri-miR-96 en células eucariotas. En primer lugar, se amplificó, a partir de DNA genómico de un individuo portador en heterocigosis de cada mutación, un fragmento que contenía la secuencia del pre-miR-96 flanqueado por 134 bases hacia 5' y 75 bases hacia 3', con el fin de simular la estructura del pri-miR. Los oligonucleótidos utilizados se modificaron añadiendo en 5' una diana para la enzima de restricción XhoI en el oligonucleótido directo: 5'-

TTTCTCGAGGAGGCCTTGAGGAGGAGCAG-3', y una para KpnI en el oligonucleótido reverso: 5'-TTTGGTACCGGCCTCCGGAGCACCTTAC-3'.

Para la reacción de PCR se mezclaron 0.75 U de DNA polimerasa Pfu Turbo<sup>®</sup> (2.5 U/μl) (Stratagene), 0.6 pmoles de cada oligonucleótido, 3 nmoles de cada dNTP, 1.5 μl de tampón de reacción 10X con 20 ng de DNA genómico en un volumen total de 15 μl. El programa utilizado fue el 150TD (ver apartado 2.3.1). Los “pri-miR” amplificados y el vector expresión psiUx (Denti y col. 2004) se digirieron de forma secuencial con las enzimas KpnI y XhoI (Roche) y se purificaron con QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Para la reacción de ligación, se mezclaron en proporción molar 5:1 el “pri-miR” y el vector, ambos digeridos y purificados, y se añadió 1 μl de tampón reacción 10X y 2.5 U de T4 ligasa (Roche) en un volumen final de 10 μl. La reacción se mantuvo a 15 °C durante 16 horas. De la mezcla de ligación se utilizaron 5 μl para transformar bacterias competentes XL1-Blue (Stratagene) según el protocolo facilitado por la casa comercial. De los clones obtenidos se seleccionaron mediante secuenciación directa, al menos un clon con secuencia silvestre, psiUx-miR-96wt, y otro portador de cada mutación, psiUx-miR-96+13G>A y psiUx-miR-96+14C>A.

#### 4.2 Transfecciones y Northern blot

Los vectores generados se utilizaron para conseguir células transfectantes que expresaran cada una de las tres variantes de miR-96 en estudio, silvestre, miR-96+13G>A y miR-96+14C>A, de forma transitoria. Para ello, se sembraron  $2.5 \times 10^5$  células HeLa por placa de 60 mm y se mantuvieron en medio *Dubelcco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado con 2 mM L-Glutamina y 10% (v/v) de suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen) durante 18 horas a 37 °C y 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo, se transfectaron independientemente mediante Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con 6 μg del plásmido psiUx-miR-96wt, psiUx-miR-96+13G>A o psiUx-miR-96+14C>A. Como control negativo se sustituyó la preparación de vector por agua. Las células transfectadas se mantuvieron 48 horas en cultivo tras lo cual, se extrajo el RNA total mediante el kit miRVana (Ambion) según las recomendaciones del proveedor. El RNA obtenido se utilizó para comparar la expresión de las tres variantes de miR-96, silvestre, miR-96+13G>A y miR-96+14C>A, mediante un experimento de Northern blot. Para ajustar las concentraciones de las muestras de RNA, primero se cuantificaron mediante espectrofotometría y después, tras comprobar su integridad en un gel de agarosa teñido con ETBr, se cuantificaron las bandas de RNA ribosómico. Seguidamente, cantidades

equivalentes de cada muestra de RNA se cargaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15%, se separaron mediante electroforesis y posteriormente, se transfirieron a una membrana Hybond NX (Amersham) y se fijaron con carbodiimida (Pall y cols 2007). Para la detección del miR-96 se utilizaron sondas compuestas por una proporción variable de monómeros LNA (*Locked Nucleic Acid*), que son análogos de los nucleótidos y se diferencian de éstos en que la ribosa tiene una conformación restringida debido a la existencia de un puente extra que conecta los carbonos 2' y 4'. Se diseñaron tres sondas diferentes con secuencias complementarias a cada una de las variantes alélicas del miR-96 maduro en estudio: silvestre, miR-96+13G>A y miR-96+14C>A. Para controlar que la carga de cada RNA fuera la misma se utilizó una sonda complementaria al microRNA let-7. La membrana se hibridó independientemente con cada sonda LNA marcada con  $\gamma$ -ATP diluida en tampón de hibridación ULTRAhyb-oligo (Ambion) a 37 °C durante una noche. Posteriormente, se lavó dos veces durante 30 minutos con tampón de baja astringencia (0.1% SDS + 0.2X SSC). Para revelar la señal radiactiva de las sondas se utilizaron películas de rayos X, que tras ser expuestas a la membrana durante una noche, se revelaron con un equipo FX pro plus phosphorimager (BioRad). La intensidad de la señal de las bandas del Northern blot se cuantificó sobre las películas reveladas, mediante el programa Kodak 1D 3.5 (Scientific Imaging Systems), y se expresó en unidades arbitrarias (UA). Después de cada proceso de hibridación, la membrana fue lavada para eliminar la sonda presente y reacondicionada para la hibridación con la siguiente sonda.

## **5. Análisis funcional de las variantes alélicas del miR-96**

### **5.1. Diseño y construcción de vectores y siRNAs**

La capacidad represora de las formas maduras mutadas del miR-96 en relación a la capacidad de la forma madura silvestre se valoró mediante experimentos clásicos de cuantificación de la actividad luciferasa, que se usó como gen indicador. Para ello se construyeron vectores en los que, en la región 3' del gen de la luciferasa se acoplaron fragmentos génicos (Anexo 2) que contenían dianas evolutivamente conservadas para el miR-96 silvestre, el miR-96+13G>A o el miR-96+14C>A. Los fragmentos seleccionados como dianas del miR-96 silvestre pertenecían a genes seleccionados mediante el programa informático miRanda 3.0 (Enright y cols. 2003), que se utilizó para buscar secuencias que fueran totalmente complementarias a la región *seed* del miR-96 silvestre, en las regiones 3'UT de genes conocidos que se expresaban en el oído interno. Dicho programa asignaba un valor de probabilidad (P) distinto dependiendo de si las secuencias complementarias

halladas eran únicas, múltiples o estaban conservadas evolutivamente. El valor de  $P$  permitió elegir el nivel de confianza del estudio (Griffiths-Jones y cols 2006); de todos los genes que el programa predijo como dianas, se descartaron aquellos con valores de  $P > 0.001$ . En el caso de los fragmentos que se emplearon como dianas adquiridas de los miR-96 portadores de mutación, la selección se llevó a cabo mediante el programa informático TargetScan (John y cols. 2004; Lewis y cols. 2005). Los criterios de búsqueda de las posibles dianas fueron, la complementariedad total con las regiones *seed* de los mutantes miR-96 +13G>A y miR-96 +14C>A, la conservación evolutiva de la posible región de unión y la expresión en oído interno del gen diana.

Para amplificar y clonar de forma dirigida los fragmentos seleccionados, se diseñaron oligonucleótidos modificados en el extremo 5' mediante la adición de dianas para dos enzimas de restricción: BglII en los oligonucleótidos directos y NheI en los oligonucleótidos reversos (Tabla 4). La amplificación de los fragmentos se llevó a cabo sobre DNA genómico de un control normoyente. Para realizar los ensayos se eligió un vector basado en el pGL3-Control Vector (Promega) que había sido modificado con el fin de poder clonar en la región 3' del gen de la luciferasa. La modificación consistió en la eliminación del sitio de clonado múltiple original del vector pGL3, y la inserción de otro, constituido por los sitios para las enzimas 5' BglII-XhoI-SmaI-NheI-SacI 3', en la diana XbaI, localizada en la región 3' del gen de la luciferasa. El vector y los fragmentos génicos a clonar se digirieron con las enzimas BglII y NheI (Roche). La purificación de los productos de digestión, ligación y transformación en bacterias, se realizaron según lo descrito en el apartado 4.1. Los clones obtenidos se secuenciaron y de entre los correctos, se eligió uno por cada gen utilizado. Para referirnos a estos clones utilizaremos el nombre pGL3-3'UTR.

Para verificar experimentalmente que el efecto observado sobre la actividad luciferasa se debe a la interacción específica del miR-96 silvestre con la diana clonada en los vectores pGL3-3'UTR (ver anexo 2A) se modificaron dichos vectores mediante la sustitución de las siete bases complementarias a la región *seed* del miR-96 silvestre, presentes en los fragmentos clonados, por un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción SalI (pGL3-3'UTRmut).



**Tabla 4. Oligonucleótidos modificados para clonar las regiones 3'UT que contienen dianas complementarias a la región *seed* del alelo miR-96 indicado.**

Dianas para miR-96 silvestre		
Gen	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso
<i>AQP5</i>	<u>TTTAGATCT</u> AGCTGACCACCCGCTGACC	<u>TTTGCTAGC</u> GGATCCCTTCAGCTCTTGAGGA
<i>CELSR2</i>	<u>TTTAGATCT</u> CATGCCCTGCTCCTGTCTTGT	<u>TTTGCTAGC</u> TGGCCCCCTCACCGTTCTG
<i>MYRIP</i>	<u>TTTAGATCT</u> TCCAGTACTCCTTGCTGATGCTGT	<u>TTTGCTAGC</u> GCCACATGACTTCTTTCCCTATCC
<i>ODF2</i>	<u>TTTAGATCT</u> GGCCCGCATACCAAGATGAG	<u>TTTGCTAGC</u> CAGCTGCGGAGCACACAGG
<i>RYK</i>	<u>TTTAGATCT</u> AACACCGTGCCTTAGAAATGCTT	<u>TTTGCTAGC</u> TGTACAAGGCAGACCAGGTATCTTT
Dianas para miR-96 +13G>A (miR-514)		
Gen	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso
<i>COL2A1</i>	<u>TTTAGATCT</u> CTCTGCACTGAATGGCTGACCT	<u>TTTGCTAGC</u> CATGCCTACAGAACGGAGGATTA
<i>MYO1B</i>	<u>TTTAGATCT</u> AATTTACAAGGGTTCATTTTGGA	<u>TTTGCTAGC</u> TGTTTGGATTGTAAACCTTTCTGA
<i>SEMA6D</i>	<u>TTTAGATCT</u> AGCTCACAGGGGCTACCTTACC	<u>TTTGCTAGC</u> ATGCTACAGCTTGGGTCAAAGATT
<i>ZIC1</i>	<u>TTTAGATCT</u> TTTGTACTGAATGGCAAGAATGTTT	<u>TTTGCTAGC</u> TTTGCCAAAAGTAACGGACAGTT
Dianas para miR-96+14C>A		
Gen	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso
<i>SCL19A2</i>	<u>TTTAGATCT</u> CATATGCTTCCCAGAGAAGCTCAT	<u>TTTGCTAGC</u> ACTAGCAGCCCCTTGGTAGACTG
<i>TJP1</i>	<u>TTTAGATCT</u> CATGTTTGTGATTGACGGGACTG	<u>TTTGCTAGC</u> GGGTAAGGCATTTCTGCTGGTT
<i>LMX1A</i>	<u>TTTAGATCT</u> CCATATTCTTTGAGGGGTCAGT	<u>TTTGCTAGC</u> GACATGGTGGGAAGTTGTTAGGA
<i>MYLK</i>	<u>TTTAGATCT</u> TGGCCACGATGAAACAGATTT	<u>TTTGCTAGC</u> CTGTGGCAATACTGTGGCTATCAT
<i>FMNL2</i>	<u>TTTAGATCT</u> CTCTTTAATTCCACCTAAGCCTCT	<u>TTTGCTAGC</u> AAACAGAAAAGAACATGCCAACG

La modificación añadida a los oligonucleótidos para generar la diana de restricción BglII se destaca en color rojo, y en color azul, la que genera la diana NheI.

Para simular la presencia del miR-96 en la célula, se diseñaron siRNAs, moléculas de RNA pequeñas bicatenarias, que mimetizaban las secuencias de la forma madura silvestre del miR-96, (siR96 wt) y de cada uno de las dos formas maduras mutadas, siR96 (+13G>A) y siR96 (+14C>A). Las secuencias de estos siRNAs fueron las siguientes (la base mutada se destaca en negrita, en cada caso):

siR96 wt: 5'-UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU-3'  
 siR96 (+13A): 5'-UUUG**AC**ACUAGCACAUUUUUGCU-3'  
 siR96 (+14A): 5'-UUUG**GA**ACUAGCACAUUUUUGCU-3'

La secuencia de la cadena “complementaria” que hace las veces de miR-96\* fue la que sigue: 5'-CAAUCAUGUGUAGUGCCAAUAU- 3' (Roche). Como control positivo de los ensayos, se construyeron vectores pGL3 en los que se clonaron en la región 3' del gen de la luciferasa, oligonucleótidos bicatenarios que recreaban dianas con perfecta complementariedad a cada una de las variantes del miR-96 en estudio (pGL3-miR-96). Como control negativo se utilizó un siRNA con igual secuencia al miR-140 (dos oligos: 5'-CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG-3' y 5'-ACCAUAGGGUAAAACCACUGAG-3') (Dharmacon) que no presentaba dianas en ninguno de los fragmentos clonados.

### 5.2. Transfecciones y ensayos de actividad de la Luciferasa.

Las células NIH-3T3 mantenidas en DMEM suplementado con 2 mM de L-Glutamina y 10% (v/v) de FCS (Gibco, Invitrogene) se sembraron a una densidad de  $3 \times 10^4$  células por pocillo. Tras 18 horas se realizaron varias transfecciones independientes para cada gen seleccionado utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen).

- Ensayos para los genes diana del miR-96 silvestre

Se diseñaron tres grupos de ensayos según el vector utilizado:

1. pGL3-3'UTR (300 ng)
2. pGL3-3'UTRmut (300 ng)
3. pGL3-miR-96 (control positivo) (300 ng)

Cada uno de estos tres ensayos se repitió añadiendo en cada caso 10 nM de siR96 wt (300 ng), 10 nM de siR96 (+13G>A) (300 ng), 10 nM de siR96 (+14C>A) (300 ng) o 10 nM de siR140 (300 ng). Como control negativo, se sustituyeron las preparaciones de siRNA por agua.

- Ensayos para los genes diana de las formas maduras mutadas miR-96+13G>A y miR-96+14C>A

Se diseñaron dos grupos de ensayos según el vector utilizado:

1. pGL3-3'UTR (300 ng)
2. pGL3-miR-96 (control positivo) (300 ng)

Ambos ensayos se repitieron añadiendo en cada caso 10 nM de siR96 wt (300 ng), 10 nM de siR96 (+13G>A) (300 ng), 10 nM de siR96 (+14C>A) (300 ng) o 10 nM de siR140 (300 ng). Como control negativo, se sustituyeron las preparaciones de siRNA por agua.

Los ensayos que se indican se llevaron a cabo por triplicado y se utilizaron, al menos, dos preparaciones independientes de cada vector. Las células se procesaron 24

horas después de la transfección mediante el kit Luciferase Reporter Gene Assay (Roche) según las indicaciones de la casa comercial y se midió la actividad de la luciferasa en un contador de luminiscencia (multilabel) Victor2 (Perkin-Elmer, MA). La actividad total se normalizó en relación a la cantidad total de proteína que se valoró mediante el kit BCA Protein Assay (Pierce), lo que permitió corregir las diferencias en la cantidad de células que pudiera haberse dado entre los pocillos. Los datos procedentes de las células tratadas con siRNAs, se expresaron en relación porcentual tomando como valor máximo de actividad enzimática el obtenido para cada vector por separado.

## **6. Direcciones WEB**

### **6.1 Bases de datos**

NCBI (*National Center of Biotechnology Information*): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

ENSEMBL: <http://www.ensembl.org/index.html>

Hearing Loss Home Page: <http://webho1.ua.ac.be/hhh/>

### **6.2 Información miRNAs: secuencias, estructura y dianas**

MFOLD: <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi>

TARGETSCAN: <http://www.targetscan.org/>

MIRBASE: <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>



## **RESULTADOS**

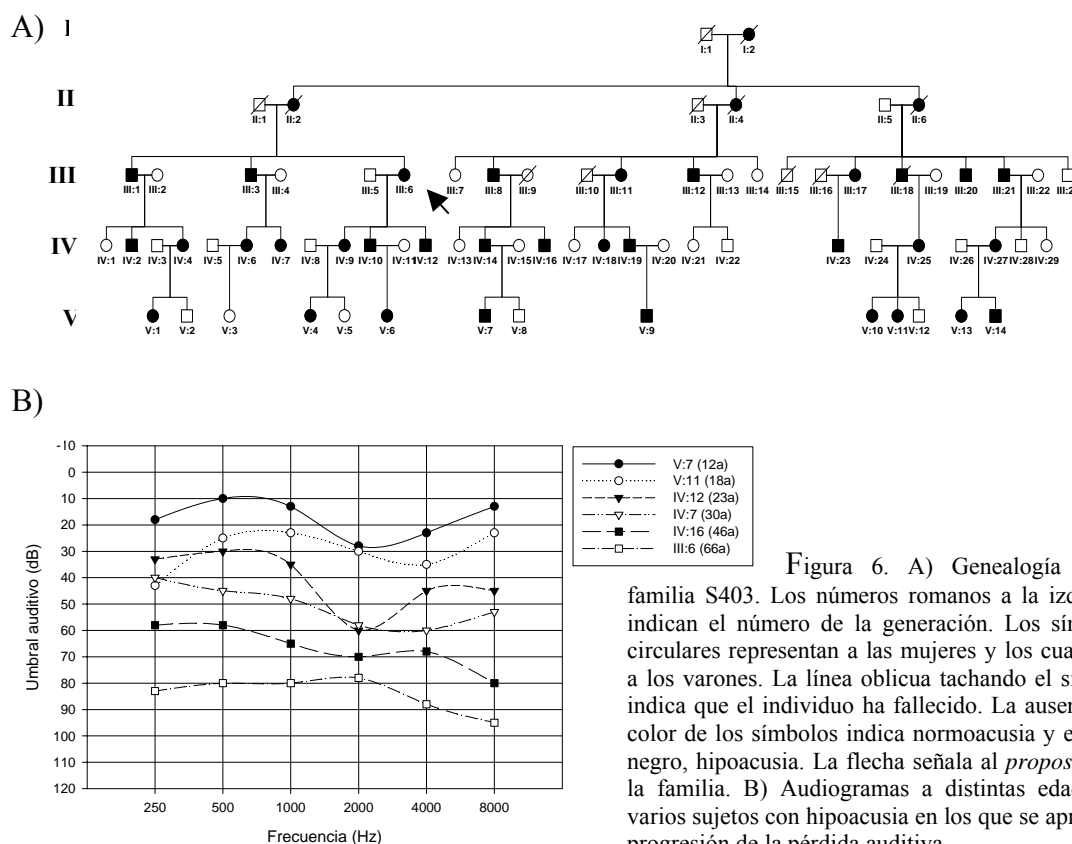


## RESULTADOS

### 1. Datos clínicos de las familias con hipoacusia DFNA50

#### 1.1. Familia S403

La familia S403 fue remitida a la Unidad desde el Hospital Universitario de Valladolid. El *propositus* (individuo III:6) presentaba un historial familiar de hipoacusia no sindrómica que se heredaba según un patrón autosómico dominante con penetrancia completa (Fig. 6A). La manifestación más temprana de la sordera fue detectada en los individuos V:7 y V:9, a los doce años de edad. La pérdida auditiva que presentan los sujetos de esta familia se caracteriza en su etapa inicial, por ser moderada y afectar a todas las frecuencias (audiograma plano, Fig. 6B). Con la edad, la hipoacusia evoluciona hasta llegar a ser grave o profunda en la séptima década de la vida. Ningún individuo afectado presenta manifestaciones clínicas que sugieran una disfunción vestibular. Sólo el individuo III:12 refiere episodios esporádicos de acúfenos bilaterales.



## 1.2. Familia S1334

La familia S1334 fue remitida a la Unidad desde el Hospital Universitario Gregorio Marañón de Madrid. Los miembros afectados de la familia presentan hipoacusia neurosensorial que se hereda según un patrón autosómico dominante con penetrancia completa. En este caso, la manifestación más temprana de pérdida auditiva se registró a los 2-3 años de edad en el *propositus* (individuo III:1) (Fig. 7A). La pérdida auditiva afecta principalmente a las frecuencias medias y altas, y progresa con la edad hasta llegar a ser grave en la tercera década de la vida (Fig. 7B). Ninguno de los miembros con hipoacusia presenta síntomas de afectación vestibular. Los individuos II:2 y III:1 no padecen malformaciones en el oído interno ni problemas oftalmológicos (ver apartado 1 de Pacientes y Métodos).

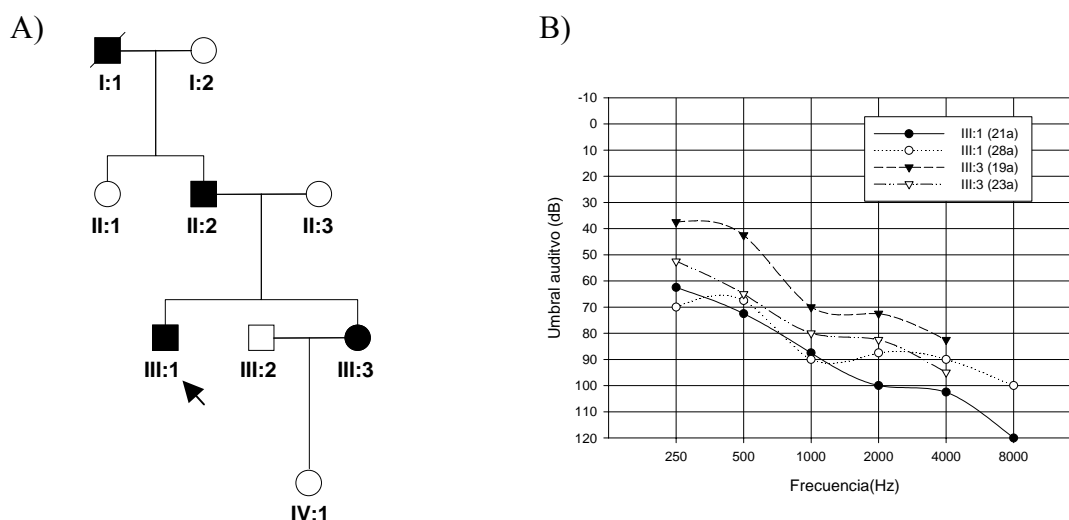


Figura 7. A) Genealogía de la familia S1334. La simbología se corresponde con la ya descrita en la figura anterior (Fig. 1A). B) Perfiles audiométricos de los individuos III:1 y III:3 a distintas edades en donde se aprecia la progresión de la pérdida auditiva.

## 2. Mapeo del locus DFNA50

Dado que la hipoacusia en la familia S403 se heredaba según un patrón autosómico dominante, se comenzó por estudiar aquellos *loci* de sordera asociados a este modelo de herencia que habían sido descritos hasta el momento: (DFNA1, A2, A3/B1, A4, A5, A6/14, A7, A8/12/B21, A9, A10, A11/B2, A13, A15, A16, A17, A18, A19, A20/26, A22, A23, A24, A25, A27/B25, A28, A30/OTSC1, A32, A34, A36/B7/B11, A37, A39). Para ello, se genotiparon los individuos de la familia para marcadores polimórficos tipo microsatélite que flanqueaban cada uno de estos *loci*. Los resultados del análisis de



ligamiento a dos puntos y el análisis de los haplotipos indicaban que ninguna de las localizaciones estudiadas estaba asociada a la sordera en la familia, lo que sugería que un nuevo *locus* podría estar implicado en ella. En el análisis de ligamiento, no se incluyeron los resultados de genotipado de tres miembros de la última generación, V:3, V:8 y V:12, por tener una edad inferior a la edad de inicio de la hipoacusia en la familia.

Posteriormente y en colaboración con el Dr. Lathrop, del Centro Nacional de Genotipado (Evry, Francia) se realizó un análisis a genoma completo utilizando 394 marcadores microsatélite distribuidos por todo el genoma, a intervalos de 10 cM aproximadamente. El análisis de ligamiento a dos puntos reveló un LOD *score* máximo de 10.66 a  $\theta=0$  para el marcador D7S530 situado en el cromosoma 7q32. Para confirmar este resultado y refinar la región asociada a la sordera, se genotiparon todos los miembros de la familia para marcadores microsatélite que flanqueaban al D7S530. Se obtuvieron valores de LOD *score* significativos ( $Z>3$ ) a  $\theta=0$  para los marcadores D7S3304, D7S461 y D7S2544 (Tabla 5). Por otro lado, el análisis de los haplotipos (Fig. 8) mostró la existencia de un evento de recombinación en los individuos III:11 y III:12, ocurrida entre los marcadores D7S1875 y D7S3304 que indicaba que la región asociada a la hipoacusia se localizaba desde el marcador D7S1875 hacia el telómero. Por otro lado, en el individuo IV:9 se observó otro evento de recombinación entre los marcadores D7S2544 y D7S2519 que señalaba que la región crítica se encontraba desde el marcador D7S2519 hacia el centrómero. Teniendo en cuenta estos resultados, el intervalo crítico que segregaba con la sordera en esta familia quedó acotado por los marcadores D7S1875 y D7S2519, separados por una distancia genética de 3.8 cM, que corresponde a 2.21 Mb en el mapa físico. Al no existir solapamiento con ningún otro *locus* de sordera síndrómica o no síndrómica, se le asignó un nuevo nombre, DFNA50, de acuerdo con el Comité de Nomenclatura Genética HUGO (HGNC).

**Tabla 5. Valores de LOD score obtenidos en el test de ligamiento a dos puntos entre el locus DFNA50 y marcadores microsatélite de la region 7q32**

Marcadores	Fracciones de recombinación ( $\theta$ ):							$Z_{\max}$	$\theta_{\max}$
	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40		
D7S515	$-\infty$	-0.64	2.33	3.16	3.23	2.52	1.40	3.34	0.15
D7S486	$-\infty$	0.22	2.51	3.09	2.97	2.23	1.14	3.16	0.13
D7S480	$-\infty$	4.72	5.49	5.28	4.16	2.67	1.16	5.49	0.06
D7S2486	$-\infty$	2.42	3.97	4.16	3.54	2.43	1.13	4.17	0.09
D7S2527	$-\infty$	5.34	6.08	5.83	4.62	3.04	1.34	6.08	0.05
D7S635	$-\infty$	6.22	6.92	6.61	5.25	3.49	1.64	6.92	0.05
D7S1875	$-\infty$	5.67	6.39	6.12	4.84	3.20	1.50	6.39	0.05
<b>D7S3304</b>	5.04	4.94	4.54	4.02	2.94	1.87	0.88	5.04	0.00
<b>D7S461</b>	6.08	5.98	5.58	5.05	3.93	2.72	1.41	6.08	0.00
<b>D7S530</b>	10.66	10.48	9.75	8.81	6.78	4.55	2.17	10.66	0.00
<b>D7S2544</b>	9.60	9.44	8.79	7.93	6.11	4.12	1.98	9.60	0.00
D7S2519	$-\infty$	9.09	9.02	8.32	6.47	4.31	1.98	9.20	0.02
D7S2531	$-\infty$	9.27	9.20	8.50	6.64	4.45	2.07	9.38	0.02
D7S640	$-\infty$	7.29	7.97	7.63	6.19	4.29	2.07	7.97	0.05
D7S684	$-\infty$	3.27	4.20	4.18	3.47	2.39	1.13	4.25	0.07
D7S661	$-\infty$	0.73	3.59	4.27	3.98	2.89	1.35	4.32	0.13
D7S636	$-\infty$	-6.78	-1.05	0.93	2.08	1.97	1.22	2.14	0.23

Se muestran los valores de LOD score obtenidos para los marcadores utilizados en el refinamiento del locus DFNA50.

Los marcadores con resultados significativos (LOD score  $>3$  a  $\theta=0$ ) están destacados en negrita.

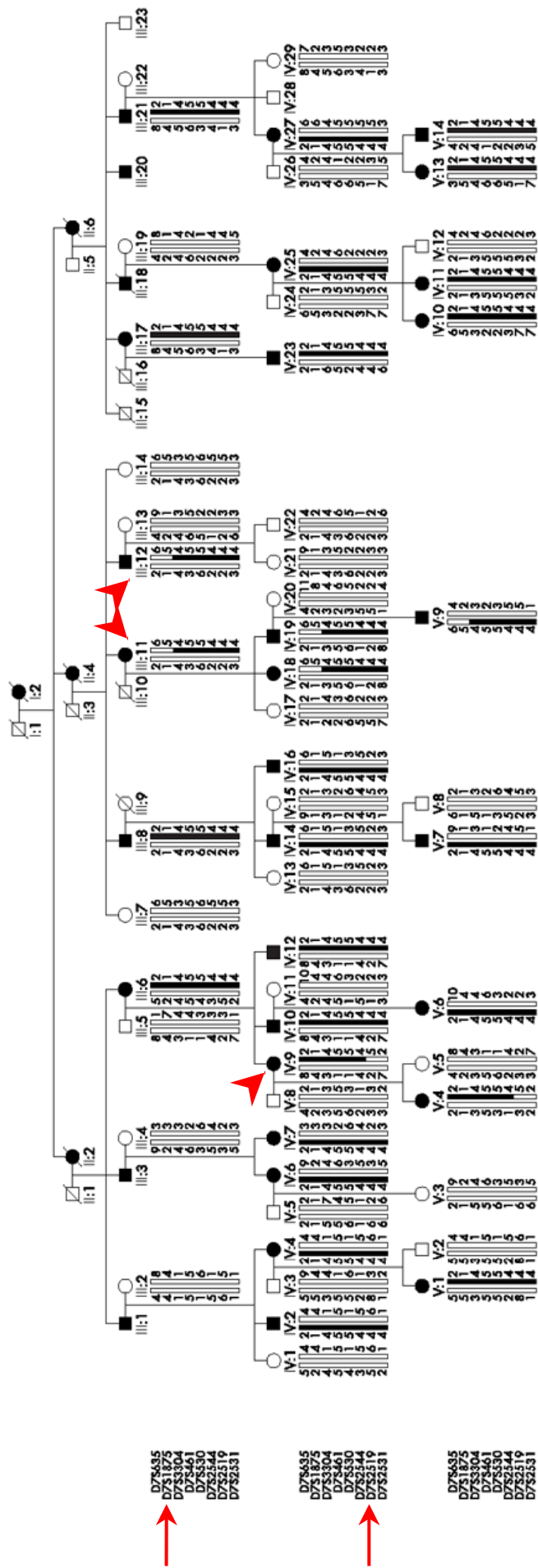


Figura 8. Análisis de haplotipos de la familia S403 para marcadores de la región cromosómica 7q32. Los alelos aparecen codificados numéricamente. El haplotipo asociado a la sordera está representado como una barra negra y los no asociados como barras blancas. Las puntas de flecha, señalan los individuos en los que se describen los eventos de recombinación críticos. Las flechas rojas indican los puntos de recombinación que delimitan el intervalo genético del *locus* DFNA50 entre los marcadores D7S1875 y D7S2319.

### **3. Análisis de los genes candidatos**

#### **3.1 Selección de genes candidatos**

Una vez que se caracterizó la región cromosómica que segregaba con la sordera en la familia S403, el siguiente objetivo fue encontrar la mutación responsable de la hipoacusia DFNA50. La estrategia elegida fue seleccionar genes candidatos de entre los anotados en el intervalo crítico que cumplieran alguna de las siguientes características: i) expresión conocida en oído interno; ii) asociación a sordera sindrómica; iii) existencia de algún modelo murino de sordera debida a mutaciones en la región del cromosoma 6, que presenta conservación de sintenia con el *locus* DFNA50 en el cromosoma 7 humano. De los 20 genes conocidos anotados en el intervalo del *locus* DFNA50 se eligieron nueve genes (*UBE2H* [GeneID 7328], *SMO* [GeneID 6608], *ATP6V1F* [GeneID 9226], *CALU* [GeneID 813], *NAG6* [GeneID 64753], *TSPAN33* [GeneID 340348], *KLHDC10* [GeneID 23008], *HIG2* [GeneID 29923], *FLNC* [GeneID 2318]) por su expresión en oído interno y/o por su potencial contribución en el desarrollo y el mantenimiento de la función coclear.

#### **3.2. Exclusión de genes candidatos**

Todos los genes que se refieren a continuación fueron excluidos como responsables de la sordera en la familia por no encontrarse mutación alguna en heterocigosis que segregara con la hipoacusia. El estudio de cada gen se realizó por secuenciación directa de cada exón y regiones intrónicas flanqueantes en el individuo afectado III:8.

- 1) *UBE2H* (7 exones) se expresa en la cóclea (Hs:372758) y codifica la enzima E2H que participa en la ruta de degradación de proteínas dependiente de ubiquitina que se lleva a cabo en el proteasoma 26S. La ubiquitinización de proteínas es un proceso muy selectivo que juega un papel fundamental en distintos acontecimientos de la vida celular como son la reparación del DNA, el ciclo celular y la resistencia ante un choque térmico (Finley y Chau 1991; Hershko y Ciechanover 1992; Jentsch 1992). De hecho, fallos funcionales de la ruta de ubiquitinización de proteínas en tejido nervioso se han asociado a determinadas enfermedades neurodegenerativas (Saigoh y cols. 1999). En el oído interno humano aún se desconoce cuál puede ser su papel específico, pero se ha visto que en la papila basilar de pollo la expresión de UBE3B, una ubiquitin ligasa, se induce inmediatamente después de un trauma acústico (Lomax y cols. 2000).

- 2) *SMO* (12 exones) se expresa en cóclea (Hs.197366) y es el gen humano homólogo al gen *Smo* de *Drosophila*. Codifica la proteína transmembranal smoothed (Smo) que participa en la vía de señalización de Hedgehog (Nybakken y Perrimon 2002) que, según la literatura, está implicada en el complejo proceso morfogénico del oído interno. (Riccomagno y cols. 2002; Hammond y cols. 2003; Liu y cols. 2002). Se encontraron tres polimorfismos silenciosos en la secuencia codificante de SMO: dos descritos en la base de datos de SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*) del NCBI como rs2703092 (c.1164C>G en el exón 6) y rs2016607 (c.1722T>C en el exón10), y otro no descrito en dicha base, localizado en el exón 5 (c.1137G>A).
- 3) *ATP6V1F* (2 exones) codifica una subunidad de la V-ATPasa (acidificación vacuolar) que funciona como una bomba de protones. Se desconoce si este gen se expresa en oído interno aunque se sabe que sí lo hacen otros componentes del mismo complejo (*ATP6V1B1* y *ATP6V0A4*), en los que se han identificado mutaciones que dan lugar a acidosis renal tubular distal asociada a sordera, desorden que se hereda según un patrón autosómico recesivo (Karet y cols. 1999; Stover y col. 2002). En el oído interno, la ATPasa podría participar en el mantenimiento del pH de la endolinfa.
- 4) *CALU* (8 exones) (Jung, Mo y Kim 2006) da lugar a una proteína llamada calumenina que pertenece a la familia CREC (*C*ab-45, *R*eticulocalvina, *E*rc-55 y *C*alumenina) que se expresa en oído (Hs.702061). Posee seis motivos manos-EF que la capacitan para unir calcio y una señal de localización en el retículo endoplásmico (RE). Se piensa que en el oído podría estar implicada en la regulación del calcio y por tanto en la transmisión de la información auditiva (Yabe y cols. 1997). Se encontraron varios cambios no patogénicos, dos de ellos ya descritos en la base de datos de SNPs del NCBI: rs1043550 (\*4G>A) y rs2307040 (c.415+97C>T), y uno no descrito c.582+35G>T (nomenclatura basada en la variante 1 del mensajero NM\_001219).
- 5) *HIG 2* (2 exones) se expresa en oído interno (Hs. 710088). La proteína HIG2 es inducida en respuesta a hipoxia y a privación de glucosa en células tumorales en cultivo (Denko y cols. 2000) y actúa como factor de crecimiento autocrino en riñón fetal y carcinoma de células renales (Togashi y cols. 2005). Se desconoce cuál puede ser su función en el oído interno. Sólo se encontró el cambio -139 T>A, situado en la región 5'UT, que no estaba descrito.

- 6) *KLHDC10* (10 exones). Este gen se expresa en oído interno (Hs.520710) y la proteína a la que da lugar presenta hipotéticamente seis motivos denominados KELCH que están presentes en proteínas con capacidad de entrecruzar filamentos de actina (Prag y Adams 2003).
- 7) *FLNC* (48 exones). Se desconoce si este gen se expresa en cóclea humana aunque sí se sabe que está presente en la de ratón (Mm. 39046). Codifica la filamina C que pertenece a una familia de proteínas que unen actina (Chakarova y cols. 2000) y están implicadas en la reorganización del citoesqueleto y las estructuras asociadas a éste. Además, las filaminas parecen funcionar como proteínas adaptadoras en multitud de redes de transmisión de señales (Vorgerd y cols. 2005). Sólo se encontraron cambios polimórficos en heterocigosis, uno de ellos en el intrón 46 c.7721-117G>A descrito como SNP (rs2639141), y otro no descrito situado en el intrón 23 c.4067+62C>T (la posición de los cambios se indica en el contexto de la variante 1, NM\_001458).
- 8) *NAG6* (18 exones), también llamado *CCDC136*. Su expresión en oído interno se ha descrito en ratón (Mm.251303) pero no en humano. Da lugar a una proteína que parece funcionar como supresora de tumores (Zhang y cols. 2004).
- 9) *TSPAN33* (9 exones). Aunque no se ha demostrado la expresión de este gen en oído interno en humano se sabe que sí se expresa en ratón (Mm.225289). Da lugar a una proteína integral de membrana también llamada *Penumbra* que pertenece a la familia de las tetraspaninas (Chen y cols. 2005). Estas moléculas parecen tener un importante papel en la organización supramolecular de complejos de señalización celular. Por ejemplo, la periferina que es miembro de esta familia, juega un papel fundamental en la morfogénesis de los discos lamelares en los bastones de la retina. De hecho, mutaciones en este gen están asociadas a degeneración retiniana y ceguera (Heikens y cols. 2007). Tras el análisis de las secuencias se encontró una duplicación de 25 pb en heterocigosis, localizada en la región anterior al comienzo de la 5'UTR, que no estaba descrita para este gen (NM\_178562), y un SNP no patogénico en la región 3'UT (SNP: rs1046499, c.\*617G>A).

### 3.3. Validación del gen asociado a la sordera DFNA50

Posteriormente, se anotaron cuatro genes nuevos en el intervalo crítico del *locus* DFNA50. Todos ellos daban lugar a RNAs no codificantes con función reguladora denominados microRNAs (miRNAs).

- 10) *MIRN129-1* [GeneID 406917]. La secuencia de este miRNA en humano, se predijo por similitud a su ortólogo en ratón (Lagos-Quintana y cols. 2002). Posteriormente se demostró la expresión de éste en la línea celular de osteosarcoma Saos-2. Se desconoce cuál es su función y si se expresa en oído. La secuenciación del precursor de este miRNA no reveló ningún cambio en el individuo analizado.
- 11) *MIRN183* [GeneID 406956], *MIRN182* [GeneID 406958] y *MIRN96* [GeneID 407053]. Estos tres genes codifican un *cluster* de miRNAs que se localiza en la región intergénica comprendida entre el gen del factor respiratorio nuclear-1 (*NRF1*) y el de la enzima conjugante de ubiquitina E2H (*UBE2H*). Todos ellos se transcriben en la misma dirección (desde el telómero al centrómero) en un único transcrito primario (Xu y cols. 2007). Esta familia de miRNAs participa en el desarrollo y diferenciación del oído interno así como en el mantenimiento de la funcionalidad de las células ciliadas (ver el apartado 4.5 de Introducción). La secuenciación de *MIRN182* reveló dos polimorfismos que se localizaban fuera de la secuencia del precursor (pre-miR-182) y que no segregaban con la sordera, mientras que en el caso del gen *MIRN183*, no se encontró ningún cambio en el precursor (pre-miR-183) ni en las regiones flanqueantes. Sin embargo, en el gen *MIRN96*, se encontró un cambio en heterocigosis, de guanina por adenina, en la posición +13 (+13G>A) de la secuencia del pre-miR-96 que se localizaba en la secuencia correspondiente a la región *seed* del miR-96 maduro. Dicha región juega un papel crucial en la especificidad de reconocimiento de los mRNAs diana por parte de cada miRNA (Fig. 9A). Mediante un ensayo basado en enzimas de restricción (ver apartado 3.2 de Pacientes y Métodos) (Fig. 9B), se confirmó que la mutación segregaba con la sordera en la familia S403 y que no estaba presente en más de cuatrocientos controles normoyentes no relacionados de la población española. Estos dos hechos demostraron la implicación causal de la mutación miR-96+13G>A en la sordera DFNA50 en esta familia.

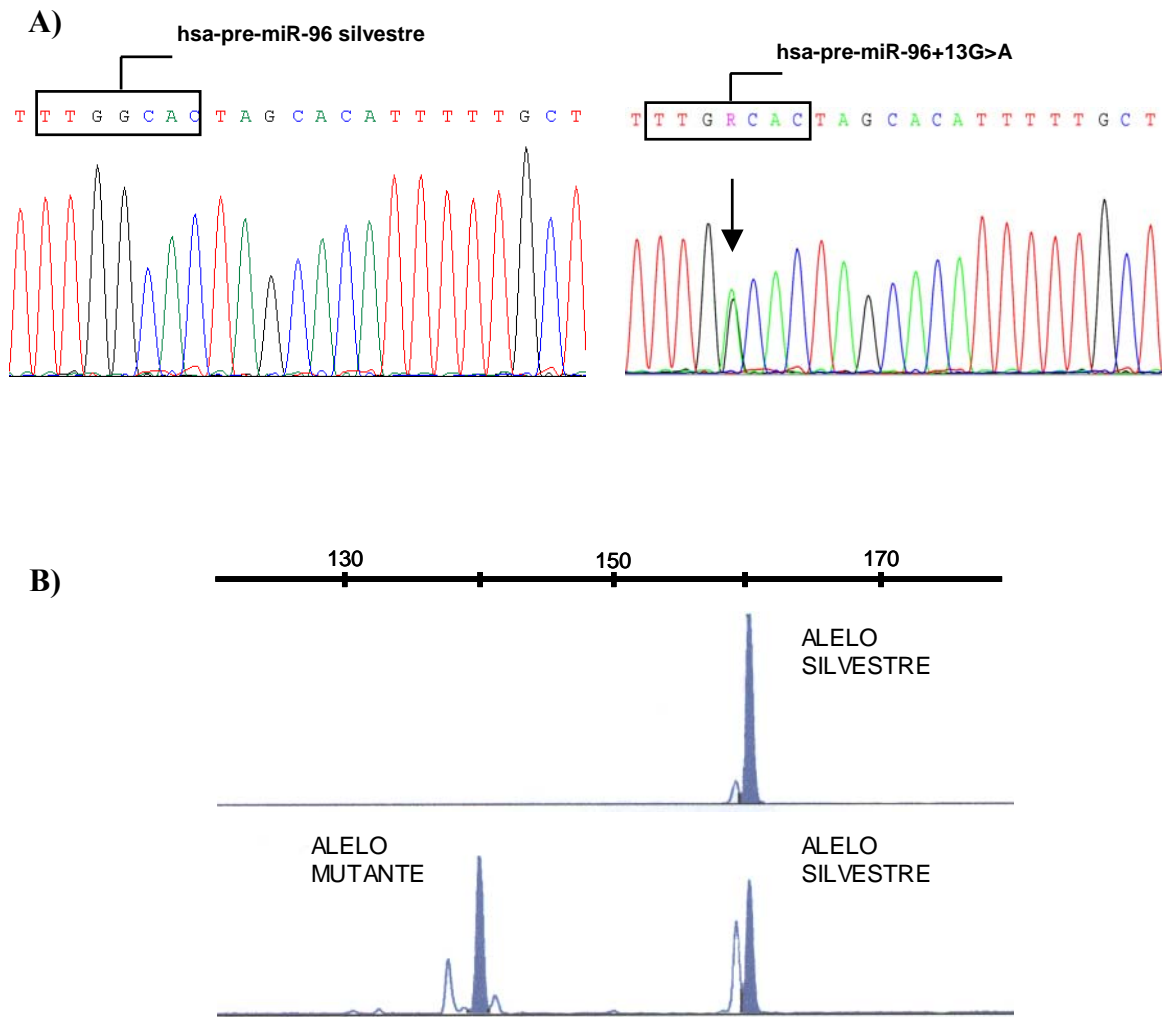


Figura 9. A) Electroferogramas que muestran la secuencia silvestre y mutada del miR-96 maduro. La región *seed* aparece recuadrada y la flecha indica la base mutada. B) Resultado de la prueba de restricción diseñada para confirmar la segregación de la mutación miR-96 +13G>A en la familia S403. Se muestra el resultado para un individuo homocigoto para el alelo silvestre (arriba) y el obtenido para uno portador en heterocigosis de la mutación (abajo). La detección del pico de menor tamaño (alelo mutante) indica que el sujeto es portador de la mutación en heterocigosis.



#### **4. Búsqueda de mutaciones en los genes *MIRN96*, *MIRN183* y *MIRN182***

La búsqueda de mutaciones en *MIRN96*, *MIRN183* y *MIRN182* se amplió al resto de familias de la colección del laboratorio que presentaban sordera neurosensorial y que no estaban diagnosticadas genéticamente. Se seleccionaron, 278 probandos de familias con un patrón de herencia claramente autosómico dominante, y 347 individuos, que correspondían a probandos de 299 familias con un patrón de herencia ambiguo aunque compatible con un modelo autosómico dominante. Los fragmentos de los genes *MIRN183*, *MIRN182* y *MIRN96* amplificados en cada probando seleccionado se analizaron mediante el sistema DHPLC (ver apartado 3.1 de Pacientes y Métodos). Los distintos perfiles cromatográficos que se obtuvieron fueron caracterizados por secuenciación directa:

- 1) miR-183. En este amplicón se encontraron dos perfiles cromatográficos que diferían del silvete. Uno de ellos correspondía a un cambio puntual en heterocigosis situado 88 pb hacia 5' del inicio del precursor (-88G>C) y el otro, a un cambio dentro del pre-miRNA, a 91 bases de su extremo 5' (+91C>G). Ninguno de ellos segregaba con la sordera en las familias en las que habían sido descritos.
- 2) miR-182. Se identificaron varios patrones cromatográficos diferentes que en su mayoría fueron detectados en varias familias. La secuenciación de uno de ellos reveló, un cambio puntual en heterocigosis dentro del pre-miRNA (+116G>A), que no segregaba con la sordera en ninguno de los 14 casos en los que se detectó y por tanto, fue considerado un polimorfismo. Además de éste, se hallaron, por un lado, dos cambios frecuentes y descritos como SNPs, situados hacia 3' fuera del pre-miRNA: +28 C>T (rs4541843), y +79C>T (rs4467881), y por otro, tres cambios más, +71T>C, +182G>A y +231G>A, que no habían sido descritos hasta el momento pero que no segregaban con la sordera en las familias en las que se identificaron.
- 3) miR-96. El análisis de este gen reveló un total de siete perfiles cromatográficos diferentes, siendo uno de ellos el correspondiente al sujeto portador de la mutación miR-96+13G>A en heterocigosis (Fig. 10) que se usó como control. Tres de los perfiles, correspondían a los siguientes cambios situados fuera de la secuencia del pre-miR96: una transversión localizada a una distancia de 13 bases hacia 5' del inicio de la secuencia del pre-miRNA (-13A>T), y dos cambios que se localizaban hacia 3' del pre-miR-96: +19G>A y +23G>A. Ninguno de estos cambios segregaba

con la sordera en las familias en la que fueron descritos. En la secuencia del precursor se encontraron los siguientes cambios: dos transiciones, una en la posición +36 (+36T>C), que correspondía a un SNP (rs.41274239) (Fig. 10A) y otra, en la posición +42 (+42C>T) que no estaba descrita (Fig. 10B) y tampoco segregaba con la sordera. El último de los perfiles encontrados (Fig. 10C) correspondía a un nuevo cambio puntual (+14C>A) que se localizaba en la secuencia del miR-96 maduro y afectaba a una base de la región *seed*, en concreto, a la base adyacente a la mutada en la familia S403 (Fig. 11A).

Mediante un test de restricción similar al utilizado en el caso de la mutación miR-96+13G>A (ver apartado 3.2 de Pacientes y Métodos) se comprobó que la mutación miR-96+14C>A segregaba con la sordera en la familia (Fig. 11B) y se descartó su presencia en más de cuatrocientos controles normoyentes de población española. En base a estos resultados, se consideró a la mutación miR-96+14C>A como la causa de la sordera en la familia S1334 (Fig. 11B).

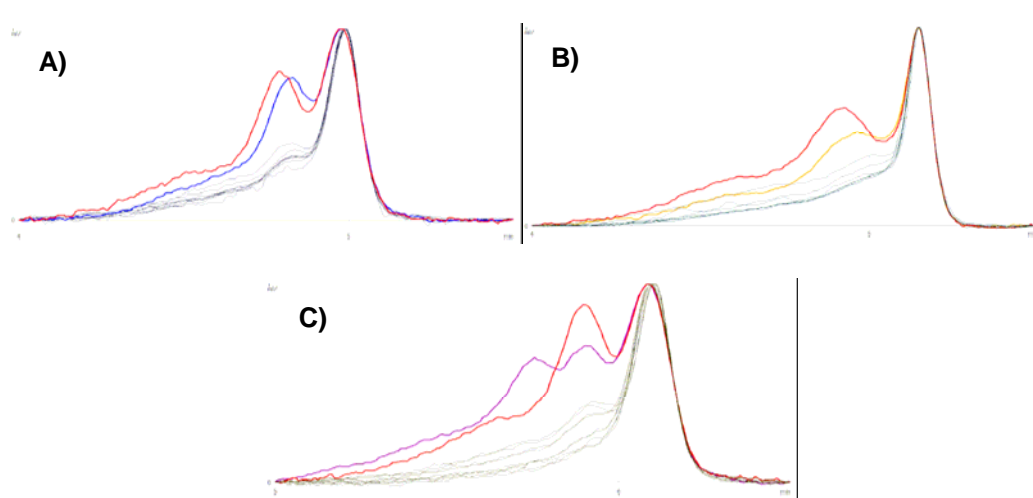


Figura 10. Tres ejemplos de los perfiles cromatográficos obtenidos como resultado del análisis mutacional del gen *MIRN96* por DHPLC. En todos los casos, el perfil en rojo corresponde al sujeto portador en heterocigosis de la mutación miR96+13G>A y los perfiles en negro, a varios individuos homocigotos para el alelo silvestre. A) El perfil azul se obtuvo para el individuo portador en heterocigosis de la mutación +36T>C; B) El perfil amarillo es el obtenido para el individuo portador en heterocigosis de la mutación +42C>T; C) El perfil en morado corresponde al sujeto heterocigoto para la mutación en la secuencia madura del miR-96 (mir-96+14C>A) que modifica la secuencia de la región *seed*.

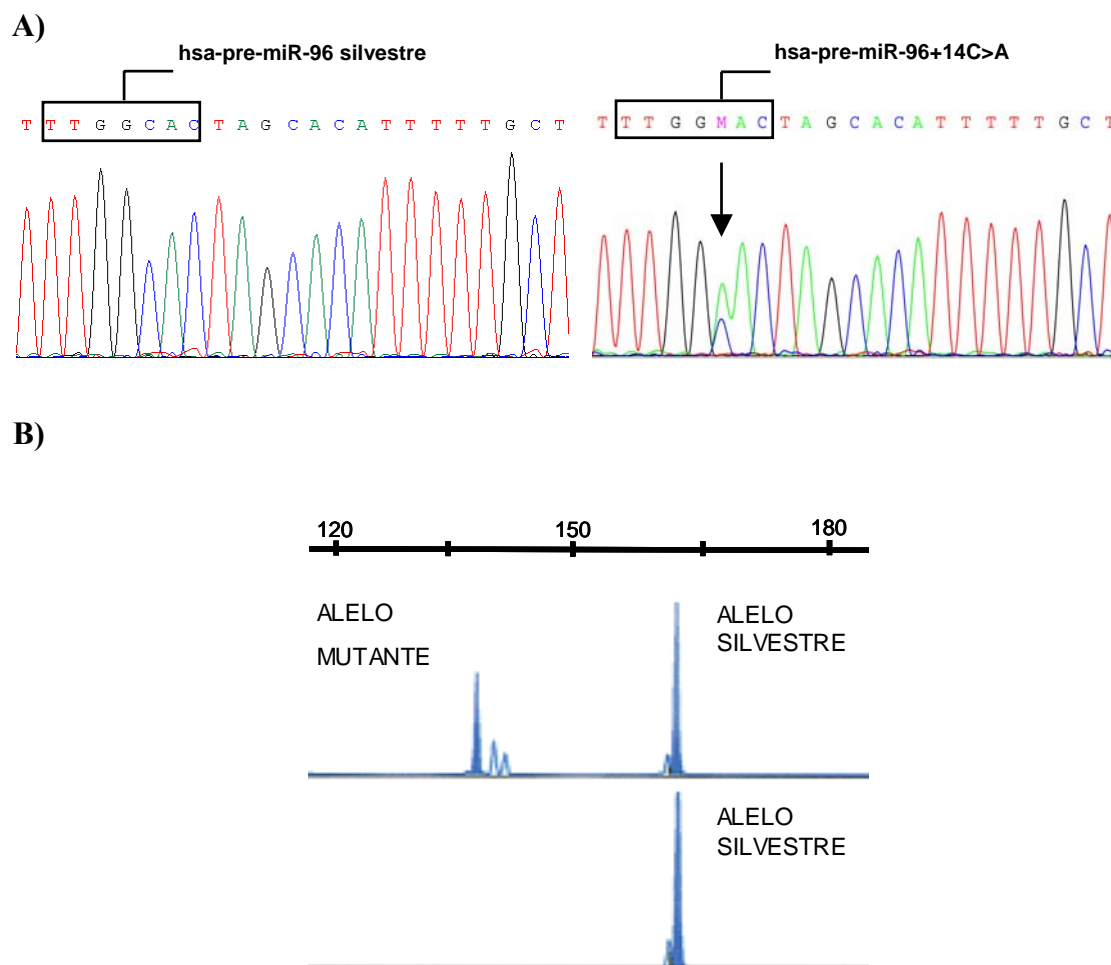


Figura 11. A) Electroferogramas que muestran la secuencia madura silvestre y mutante del miR-96. La secuencia de la región *seed* aparece recuadrada y la flecha indica la base mutada. B) Resultado del test de restricción diseñado para confirmar la segregación de la mutación miR-96+14C>A en la familia S1334. Se muestra el resultado obtenido para un individuo portador en heterocigosis de la mutación (arriba) y para un individuo homocigoto para el alelo silvestre (abajo). La detección del pico de menor tamaño (alelo mutante) indica que el sujeto es portador de la mutación en heterocigosis.

En resumen, se han encontrado dos mutaciones en el gen miR-96, miR-96+13G>A y miR-96+14C>A, asociadas con sordera hereditaria autosómica dominante en dos familias españolas. Ambas mutaciones se localizan en la secuencia del miRNA maduro, concretamente en la región *seed* y afectan a posiciones consecutivas. Ambas bases mutadas están altamente conservadas a lo largo de la evolución (Griffiths-Jones y cols. 2006;Pierce y cols. 2008).

**5. Análisis funcional de las mutaciones miR96+13G>A y miR96+14C>A**

Con el objeto de analizar el efecto que las mutaciones identificadas, miR-96+13G>A y miR-96+14C>A, ejercen sobre la estructura y la función del miR-96 se diseñaron una serie de experimentos *in silico* e *in vitro*.

**5.1. Análisis bioinformático de la estructura secundaria de la molécula precursora del miR-96 (pre-miR-96) mediante el programa MFOLD**

Se compararon las estructuras secundarias de la forma silvestre del pre-miR-96 y las de las dos mutadas mediante el programa informático Mfold (Zuker 2003). Esta comparación, reveló que ambas mutaciones daban lugar a un nuevo punto de desapareamiento en la región del tallo y un aumento en la energía libre (Fig. 12). Sin embargo, ninguna de las mutaciones parece afectar a la estructura secundaria de la región reconocida por el complejo Drosha/DGCR8 (recuadrada en la figura 12) durante el procesamiento del pri-miR-96 (Zeng, Yi y Cullen 2005).

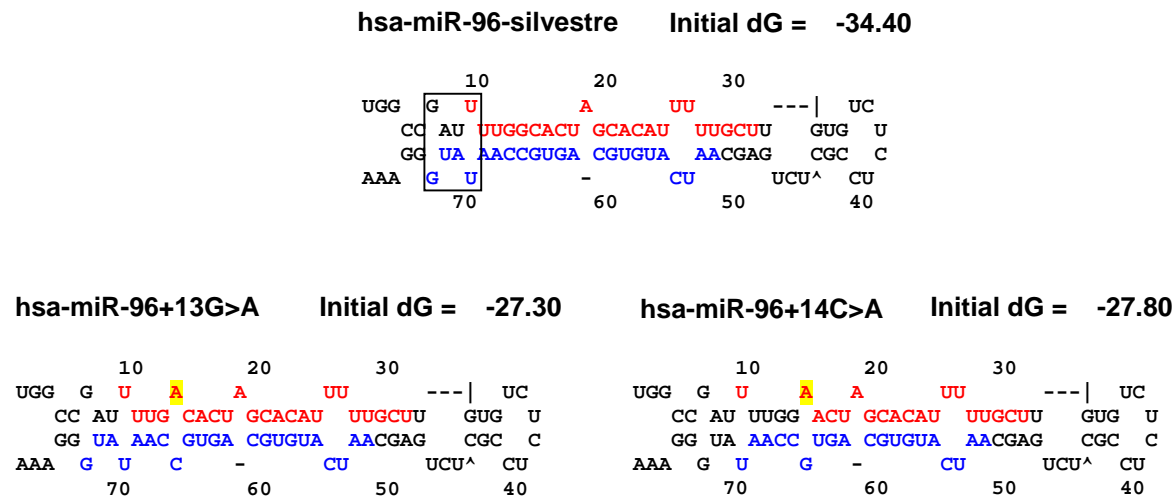


Figura 12. Resultado del análisis del programa Mfold en el que se muestra la estructura secundaria de los tres alelos de los pre-miRNAs con sus respectivas energías libres. En todos los casos el miR-96 maduro se presenta en rojo y el miR-96 \* maduro, en azul. Sobre fondo amarillo se destacan las bases mutadas. En el recuadro se señala la región en la que corta el complejo Drosha/DGCR8.

## 5.2. Biogénesis y procesamiento

La publicación del trabajo de Duan y colaboradores puso de manifiesto que la presencia de un cambio (SNP) en la región *seed* de un miRNA, en este caso el miR-125a, influía sobre el proceso de biogénesis haciéndolo menos eficaz y causaba una menor acumulación de la forma madura mutada de este miRNA (Duan y cols. 2007). Teniendo en cuenta estos resultados, se diseñaron diferentes experimentos para estudiar el posible efecto de las dos mutaciones encontradas en la región *seed* del miR-96 sobre el proceso de maduración de este miRNA, que se llevaron a cabo en colaboración con el laboratorio del Dr. Tamas Dalmay (Norwich, UK). Como etapa inicial, se clonaron fragmentos de DNA que simulaban a los pri-miR-96 correspondientes a los alelos silvestre, miR-96+13G>A y miR-96+14C>A, en el vector psiUx (ver apartado 4.1 de Pacientes y Métodos) (Fig. 13A). El estudio comparativo de la expresión de las tres variantes alélicas encontradas en este trabajo se llevó a cabo mediante un Northern blot a partir del RNA extraído de células HeLa que expresaban transitoriamente cada una de estas variantes (ver apartado 4.2 de Pacientes y Métodos). Para la detección de la forma madura silvestre del miR-96 y de las dos formas maduras mutadas, se diseñaron tres sondas LNA complementarias a cada una de ellas: silvestre, miR-96+13G>A y miR-96+14C>A, ya que cada una reconocía de manera óptima a la variante a la que era totalmente complementaria y con menor eficacia a aquellas con las que difería en secuencia una o dos bases (Fig. 13B, parte derecha). La misma membrana se hibridó por separado con cada una de las tres sondas diseñadas contra las variantes de miR-96 (Fig. 13B, parte izquierda), y con una sonda dirigida frente al miR-let-7, que las células utilizadas expresan de forma constitutiva y cuya señal se usó como control de carga. En la figura 13, se puede ver que la acumulación del alelo silvestre es mayor que la de cualquiera de las dos formas mutantes (Fig. 13B) independientemente de la sonda utilizada. Por tanto, ambas mutaciones afectan negativamente al proceso de biogénesis del miR-96.

Las diferencias de acumulación observadas se cuantificaron mediante técnicas de análisis de imagen (ver apartado 4.2 de Pacientes y Métodos). De esta forma se pudo comprobar que el nivel de intensidad de las bandas de ambos alelos mutantes relativo al alelo silvestre estaba reducida alrededor de un 80% (Fig. 13C).

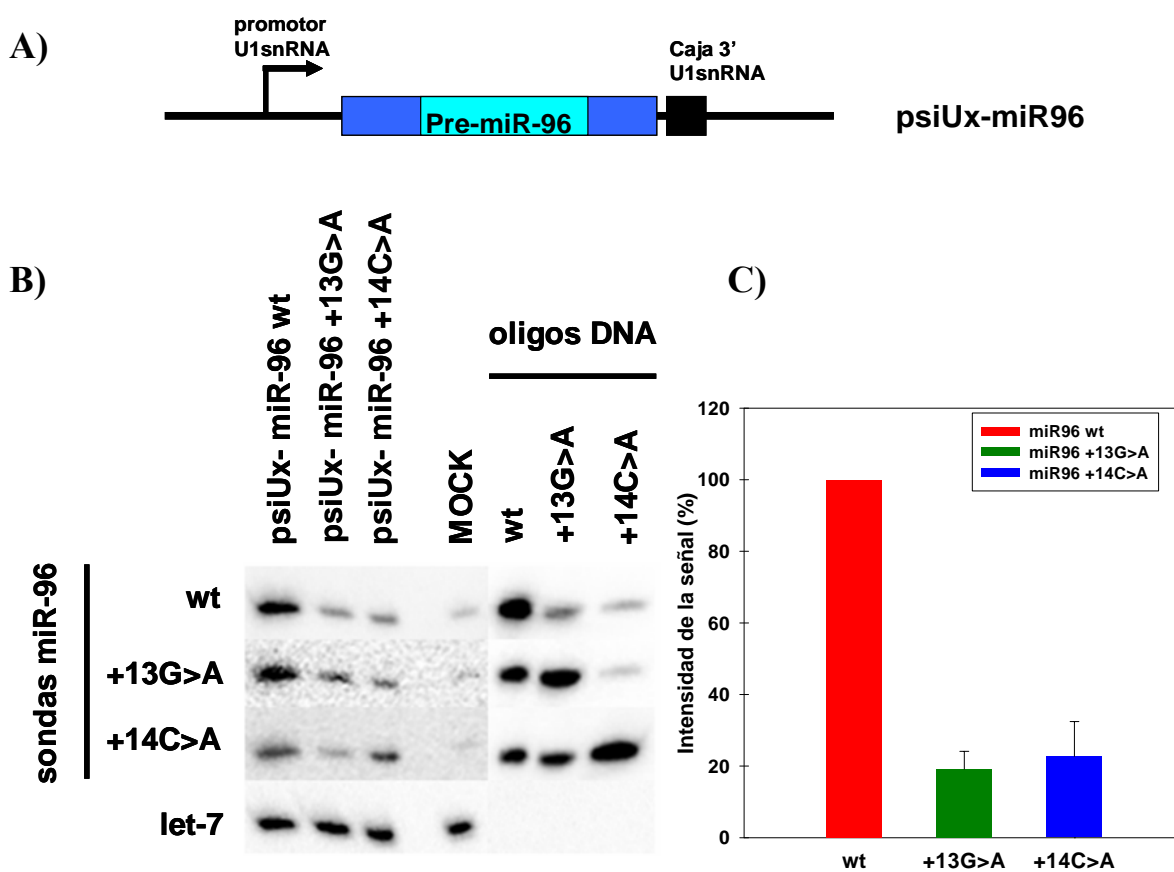


Figura 13. Las mutaciones identificadas en miR-96 afectan al procesamiento del miRNA. A) Esquema de la construcción utilizada para la expresión transitoria de las formas del miR-96, identificadas en este trabajo, en células HeLa. B) Resultado del Northern blot. Panel izquierdo: Detección de la forma madura del miR-96 obtenido a partir de las células transfectadas con los vectores de expresión de las formas silvestre (psiUx-miR-96 wt) y mutadas (psiUx-miR-96+13G>A y psiUx-miR-96+14C>A) del miR-96. La calle denominada MOCK da cuenta de la expresión basal de miR-96 en esta línea celular. El panel derecho corresponde a los controles de hibridación, que son oligonucleótidos de idéntica secuencia a cada uno de los tres alelos del miR-96, silvestre (wt), miR-96+13G>A y miR-96+14C>A. El blot fue hibridado secuencialmente con tres sondas wt, +13G>A y +14C>A (filas horizontales). La última fila del panel izquierdo, let-7, corresponde al control de carga. La acumulación de la molécula madura de miR-96 silvestre es mayor que la de los mutantes con independencia de la sonda empleada y a pesar de la mayor afinidad mostrada por las sondas +13G>A y +14C>A por sus respectivas moléculas mutantes (panel derecho, diagonal desde arriba-izquierda hasta abajo-derecha). Se obtuvieron resultados similares en cinco experimentos independientes. C) Cuantificación del nivel de intensidad de las formas maduras de miR-96 detectadas en el Northern blot. Cada columna del histograma refleja el promedio (promedio  $\pm$  la desviación estándar) de los valores de intensidad de las bandas de cada alelo obtenidas con las tres sondas utilizadas, una vez corregidos mediante la sustracción del valor de la intensidad correspondiente a la expresión basal del miR-96 en las células. Se observa una disminución muy significativa de la intensidad de la señal de las dos formas maduras mutadas, miR-96+13G>A y miR-96+14C>A, en relación a la intensidad de la forma silvestre (wt).

### 5.3. Efecto de las mutaciones sobre la capacidad reguladora de miR-96

#### 5.3.1. Dianas directas

La actividad reguladora de los miRNAs está mediada por el reconocimiento de secuencias específicas que son parcialmente complementarias y que se localizan en la región 3'UT de sus mRNAs diana. La especificidad de dicho proceso recae principalmente en la región *seed* del miRNA. Puesto que las mutaciones miR-96+13G>A y miR-96+14C>A se localizan en la región *seed* del miR-96, se decidió evaluar mediante ensayos clásicos de luciferasa, el posible impacto de dichas mutaciones sobre la capacidad de represión de las formas maduras mutadas del miR-96 sobre diferentes mRNAs diana. Para este ensayo se eligieron los siguientes genes por contener dianas predichas para el miR-96: *AQP5* [GeneID 362], *CELSR2* [GeneID 1952], *ODF2* [GeneID 4957], *MYRIP* [GeneID 25924] y *RYK* [GeneID 6259] y se contruyó, en cada caso, un vector (ver apartado 5.1 de Pacientes y Métodos y Fig. 14A) que contenía un fragmento de la región 3'UT del mRNA que incluía la diana potencial para el miR-96 (Anexo 2).

Estos cinco vectores pGL3-3'UTR se cotransfectaron en células NIH-3T3, con siRNAs que mimetizaban la secuencia del miR-96 silvestre, siR96 WT, y de cada uno de los mutantes, siR96 (+13G>A) y siR96 (+14C>A). Los ensayos de luciferasa realizados en el laboratorio del Dr. T. Dalmay, mostraron que la forma silvestre del miR-96, siR96 WT, efectivamente, reprimía la traducción del mensajero híbrido luciferasa-3'UTR de todas las dianas ensayadas. Sin embargo, las formas mutadas del miR-96, siR96 (+13G>A) y siR96 (+14C>A), presentaban una capacidad represora significativamente disminuida ( $p < 0.05$  en una prueba t de dos colas) en comparación con la forma silvestre, salvo en el caso del siR96+14C>A sobre la diana del gen *CELSR2* (Fig. 14B).

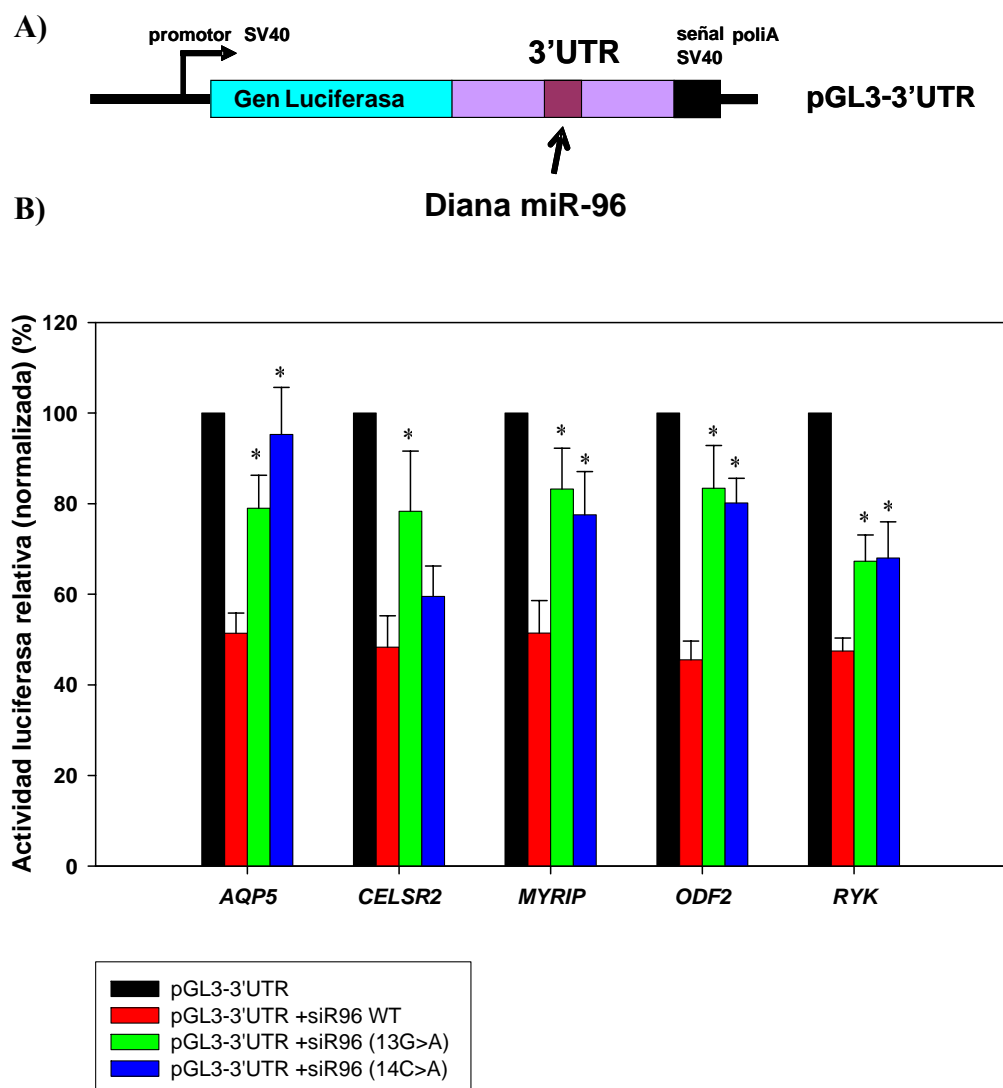


Figura 14. Ensayo de actividad de la luciferasa A) Esquema de los vectores (pGL3-3'UTR) utilizados en el ensayo luciferasa. B) Histograma en el que se representan los valores de actividad luciferasa en extractos de células NIH-3T3 cotransfectadas con los vectores pGL3-3'UTR y siRNAs que simulan el efecto de la forma madura silvestre y de las mutadas, miR-96+13G>A y miR-96+14C>A, del miR-96. La actividad luciferasa se expresa como la media  $\pm$  SEM (cuatro experimentos independientes realizados por triplicado y utilizando dos preparaciones distintas de plásmido) normalizada con respecto a la actividad obtenida para las construcciones pGL3-3'UTR en cada caso (barras negras). Se puede ver que, para cada gen, el efecto inhibitorio del siR96 silvestre es más pronunciado que el de cualquiera de los dos mutantes estudiados. Los asteriscos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$  en una prueba t de Student de dos colas,  $\alpha = 0.05$ ).



Para confirmar que los efectos observados eran específicos del miR-96 actuando sobre las dianas ensayadas, se realizaron dos experimentos adicionales:

Con el primero, se verificó la ausencia de regulación por parte del miR-140 (siR140) sobre cada uno de los mRNAs híbridos luciferasa-3'UTR diana estudiados en los que no existían sitios de unión potenciales para este miRNA (Fig. 15).

En el segundo, se analizó la actividad reguladora ejercida por las variantes alélicas del miR-96 descritas en este trabajo sobre los mRNAs híbridos luciferasa-3'UTR diana en los que los sitios potenciales de unión habían sido mutagenizados (luciferasa-3'UTRmut) (ver apartado 5.1 de Pacientes y Métodos). En todos los casos el efecto del miR-96 silvestre (siR96 WT) sobre las dianas mutagenizadas es menor que el ejercido sobre las dianas silvestres. Las diferencias observadas entre estos dos grupos son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) o están en el límite de la significación ( $p \sim 0.05$ ) (Fig. 15), salvo para el gen *RYK* ( $p > 0.05$ ) (Tabla 6). Cuando los miR-96 mutantes, siR96 (+13G>A) y siR96 (+14C>A), se enfrentaron con las dianas mutagenizadas los resultados no fueron significativamente diferentes con respecto a los obtenidos con las dianas no mutagenizadas, salvo en dos casos: para el alelo siR96 (+14C>A) frente al gen *AQP5* y para el siR96 (+13G>A) frente al gen *RYK*, en los que la diferencia sí es significativa. En ambos casos existe una reducción de la actividad enzimática que no es atribuible a la acción de los siR96 mutantes sobre la diana mutageneizada. El siR140 tampoco ejerce inhibición alguna sobre la expresión de la luciferasa-3'UTRmut en ninguno de los casos. Con todos estos datos podemos decir que los potenciales sitios de unión de miR-96 contenidos en los fragmentos de las regiones 3'UT de los genes seleccionados quedan validados como sitios de unión de miR-96 en humano.

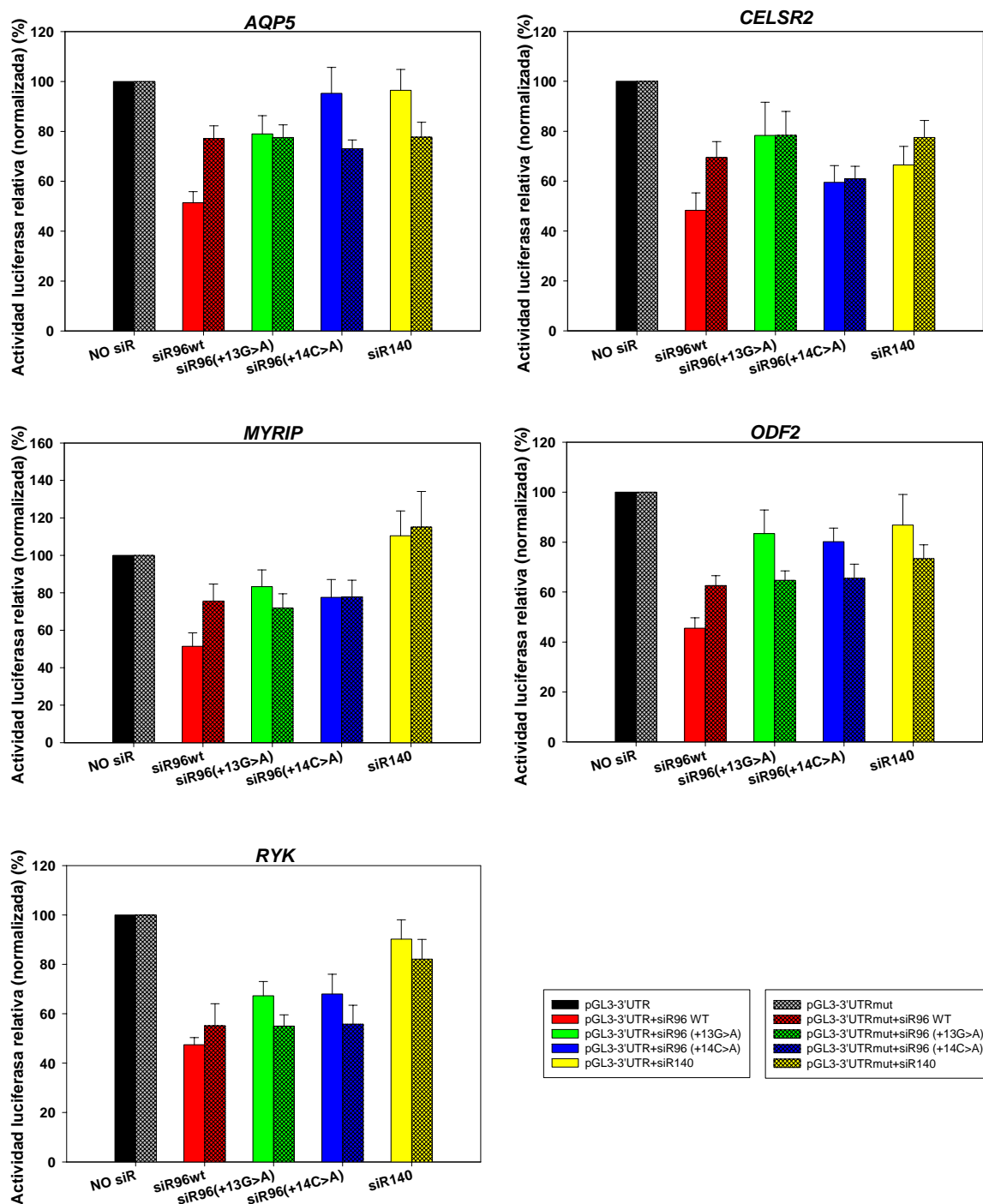


Figura 15. Valoración del efecto del miR-96 sobre los sitios de unión presentes en las regiones 3'UT clonadas una vez mutagenizadas. En cada histograma se representan los datos relativos a un gen en concreto. Las barras en color sólido reflejan los resultados de los vectores pGL3-3'UTR en cada caso, con la diana intacta; las barras con trama muestran los resultados obtenidos en cada caso para los vectores pGL3-3'UTRmut en los que la secuencia complementaria a la región *seed* del miR-96 ha sido mutagenizada. El siR140 se ha utilizado como control negativo de regulación. La actividad luciferasa se expresa como la media  $\pm$  SEM. Para la normalización de los datos se siguió el mismo procedimiento que en la figura anterior (Fig. 14).

### 5.3.2. Dianas adquiridas.

Debido a que las mutaciones identificadas alteraban la secuencia de la región *seed* del miR-96, existía la posibilidad de que las regiones *seed* resultantes tuvieran capacidad reguladora sobre nuevas dianas adquiridas. Con este fin se realizaron ensayos de luciferasa sobre potenciales dianas para cada una de las secuencias *seed* de las formas maduras mutadas de miR-96: para la región *seed* del alelo miR96+13G>A (5'-UUGACAC-3') que resultó ser idéntica a la del miR-514, se seleccionaron alrededor de 90 dianas para este miRNA; para la forma mutada miR96+14C>A (5'-UUGGAAC-3'), cuya región *seed* no se correspondía con la de ningún miRNA conocido, se obtuvieron 150 potenciales candidatos. De todos ellos, se eligieron los siguientes por su posible función en el proceso auditivo: *MYO1B* [GeneID 4430], *ZIC1* [GeneID 7545], *SEMA6D* [GeneID 80031] y *COL2A1* [GeneID 1280] se intentaron validar como dianas del mutante miR-96+13G>A (Anexo 2B) y estos otro cinco genes, *SLC19A2* [GeneID 10560], *TJP1* [GeneID 7082], *LMX1A* [GeneID 4009], *MYLK* [GeneID 4638] y *FMNL2* [GeneID 114793], como dianas del mutante miR-96+14C>A (Anexo 2C). De cada uno de estos genes, se clonó un fragmento que contenía el sitio de unión predicho por el programa informático TargetScan, en el vector de expresión pGL3 utilizado anteriormente (pGL3-3'UTR), y se realizaron los ensayos de luciferasa (ver el apartado 5.3.1 de Pacientes y Métodos) (Fig. 16). En seis de los genes analizados, la actividad luciferasa disminuía levemente cuando se ensayaban los mutantes correspondientes en relación a los valores obtenidos para el siR96 silvestre, pero sólo en dos de ellos (*SEMA6D* y *SLC19A2*) las diferencias, aunque en el límite, fueron estadísticamente significativas ( $P=0.04452$  y  $P=0.039336$ , respectivamente) (Tabla 6). Estos datos parecen indicar que no existe una ganancia de función significativa asociada a las mutaciones, al menos para las potenciales dianas adquiridas ensayadas en este trabajo.

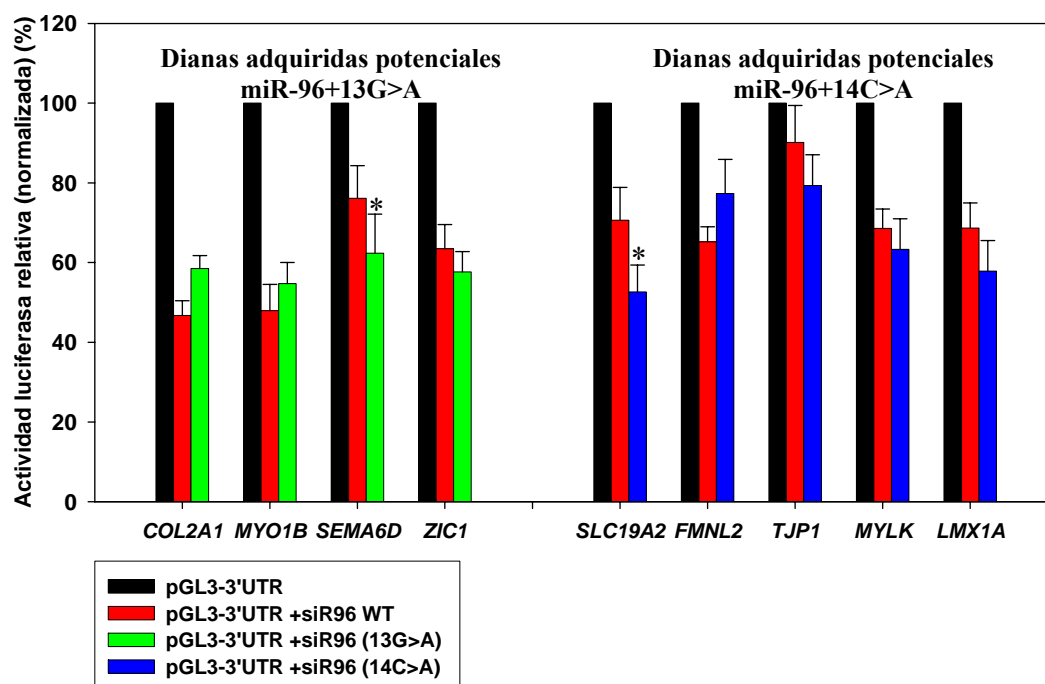


Figura 16. Ensayo de actividad de la luciferasa. Actividad luciferasa medida en extractos de células NIH-3T3 cotransfectadas con cada uno de los vectores pGL3-3'UTR y los siRNAs que simulan la presencia de las formas silvestre y mutantes, miR-96+13G>A y miR-96+14C>A, del miR-96. La actividad luciferasa se expresa como la media  $\pm$  SEM. Para la normalización de los datos se siguió el mismo procedimiento que en la figura 14. No se aprecian diferencias significativas entre el efecto del siR96 silvestre y el de los mutantes. Únicamente en el caso de *SEMA6D* y *SLC19A2* la diferencia entre el silenciamiento ejercido por el siR96 mutante y el ejercido por el silvestre, es estadísticamente significativa (indicado por asteriscos) ( $p < 0.05$  en una prueba t de Student de dos colas,  $\alpha = 0.05$ ).

**Tabla 6. Valores de P para las diferencias entre los resultados de los ensayos luciferasa para las regiones 3'UT silvestres y mutagenizadas (Fig. 15).**

pGL3-3'UTR vs. pGL3-3'UTRmut	Valores p			
	siR96 silvestre	siR96(+13G>A)	siR96(+14C>A)	siR140
<i>AQP5</i>	0.001176	0.893783	0.04592	0.12767
<i>CELSR2</i>	0.069379	0.996563	0.888369	0.399578
<i>MYRIP</i>	0.087791	0.400889	0.988862	0.867566
<i>ODF2</i>	0.002087	0.131902	0.161615	0.420748
<i>RYK</i>	0.455119	0.026575	0.223355	0.502642

Los valores de p se calcularon mediante una prueba T de Student con dos colas siendo  $\alpha = 0.05$ .

## **DISCUSIÓN**



## **DISCUSIÓN**

### **1. Efecto de las mutaciones miR-96+13G>A y miR-96+14C>A a nivel molecular**

Las mutaciones encontradas en el miR-96, miR-96+13G>A y miR-96+14C>A, responsables de la sordera DFNA50, se localizan en el miRNA maduro y alteran la secuencia de la región *seed* que determina la especificidad de reconocimiento de sus genes diana. Según los resultados obtenidos en la cuantificación por Northern blot, la cantidad de miR-96 maduro de los alelos mutantes está reducida en un 80% con respecto al silvestre, de lo que se deduce que las mutaciones estarían impidiendo el correcto procesamiento del transcrito primario (pri-miR-96) por parte de Drosha, del precursor (pre-miR-96) por parte de Dicer, o una combinación de ambos efectos. Tampoco se puede descartar un aumento en la tasa de degradación de la molécula madura de los miR-96 portadores de las mutaciones.

En el trabajo de Duan y colaboradores, se describe un polimorfismo localizado en la región seed del miR-125a maduro que también afecta a su biogénesis. Los ensayos que realizan demuestran que la base mutada afecta al procesamiento del pri-miRNA y también a la capacidad de regulación de la transcripción sobre sus mensajeros diana (Duan y cols. 2007). Aunque en un principio no se asoció a patología alguna, posteriormente, el cambio se encontró en 6 de 72 pacientes con cáncer de pecho y no se localizó en una muestra de más de 500 controles. Sólo un caso de la colección del CEPH (*Centre d'Etude du Polymorphisme Humain*) era portador del polimorfismo pero se desconoce el estado de salud del individuo (Li y cols. 2009). A pesar de que la mutación que se describe está presente en la línea germinal y por tanto, es heredable, en el trabajo no se aportan datos sobre si los casos de cáncer que se estudiaron son o no familiares. Posiblemente y debido al carácter multifactorial del cáncer, la mutación no determine pero sí aumente la susceptibilidad a desarrollar esta patología.

Recientemente, se ha encontrado en un ratón con hipoacusia generado por mutagénesis ENU (N-etil-N-nitrosurea), un cambio de A por T en el gen *Mirn96* que también afecta a la región *seed*, concretamente a la base siguiente a las mutadas en los casos de hipoacusia DFNA50 (Lewis y cols. 2009). En el caso de este ratón denominado disminuyendo (Dmdo), la presencia del miR-96 mutante maduro se valoró mediante hibridación *in situ* en cóclea. Los autores de este trabajo detectan en las células ciliadas tanto de ratones silvestres (+/+) como de mutantes homocigotos (Dmdo/Dmdo) una

expresión equivalente de miR-96, lo que supone que esta mutación *in vivo* no afectaría a la maduración del miR-96. La diferencia, en este aspecto, con las mutaciones miR-96+13G>A y miR-96+14C>A descritas en las familias con sordera DFNA50 abriría la posibilidad de que *in vivo* la presencia de estas mutaciones no afectara a la biogénesis de miR-96 o bien que las mutaciones descritas en humano y la descrita en ratón tengan diferentes mecanismos de patogénesis. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que las variaciones encontradas pueden ser debidas al método de cuantificación de las formas maduras de miR-96 (hibridación *in situ* frente a Northern blot) y/o al sistema de expresión empleado (estudios *in vivo* frente a cultivo de células no cocleares).

Sin embargo los ensayos de luciferasa llevados a cabo en estos trabajos revelan que todas las mutaciones descritas que afectan a la región *seed* del miR-125a humano y del miR-96, humano y murino, tienen un efecto negativo sobre la capacidad reguladora de dichos miRNAs. Hay que destacar que a diferencia de otras patologías mediadas por cambios en los niveles de expresión de diferentes miRNAs, la alteración de la secuencia en la región *seed* de los miR-96 mutantes en humano y ratón, no sólo afectan al silenciamiento de sus dianas primarias sino que además las nuevas regiones *seed* generadas tendrían la capacidad de unirse y silenciar a genes no regulados por el silvestre (dianas adquiridas). Esto supondría una ganancia de función de las formas mutantes. Los resultados que se presentan en este trabajo, muestran que en el caso del gen *SEMA6D* para el miR-96 (+13G>A), y el gen *SLC19A2* para el miR-96 (+14C>A) la forma mutante ejerce un silenciamiento más eficiente que la forma silvestre del miR-96 sobre la expresión del gen híbrido luciferasa-3'UTR del gen diana. Debido a las limitaciones del estudio en cuanto al número de dianas analizadas, estos resultados no pueden considerarse concluyentes, sin embargo, los estudios de expresión en cóclea llevados a cabo en el ratón disminuyendo, aportan más datos que apoyan la hipótesis de ganancia de función. Se realizaron microarrays de expresión a partir de cócleas de ratones homocigotos mutantes (Dmdo/Dmdo) y silvestres (+/+) con cuatro días de vida (P4). Los resultados obtenidos en el ratón mutante muestran un conjunto de genes cuya expresión está aumentada, y otro, cuya expresión está disminuida, con respecto al silvestre. Ambos grupos de genes se analizaron mediante el programa informático Sylamer (van Dongen y cols. 2008) que permite detectar sitios de reconocimiento de un miRNA en las regiones 3'UT de los genes seleccionados. Este análisis confirmó la presencia de regiones complementarias a la región *seed* del miR-96 silvestre en el grupo de genes sobreexpresados lo que supone que son dianas directas que han dejado de ser reconocidas por el miR-96 mutado en el ratón Dmdo. En el grupo de



genes con expresión disminuida, sin embargo, abundan las secuencias complementarias a la región *seed* generada por la mutación Dmdo, por lo que dicha mutación está influyendo directamente sobre la expresión de dianas adquiridas. En base a estos resultados y puesto que tanto la mutación del ratón Dmdo como las mutaciones miR-96+13G>A y miR-96+14C>A se localizan en la misma región funcional, la región *seed*, es probable que las formas maduras mutadas miR-96+13G>A y miR-96+14C>A presenten también una ganancia de función, aunque serán necesarios estudios más extensos para obtener resultados concluyentes.

Dentro de los genes que presentaban alterada su expresión, se halló un grupo en el que no se encontraron secuencias de reconocimiento ni para el miR-96 silvestre ni para el miR-96 Dmdo. Esto sugiere que la forma mutante miR-96 Dmdo afecta indirectamente a los niveles de expresión de estos genes, entre los que se encuentran algunos muy importantes para el buen funcionamiento y la supervivencia de las células ciliadas como son *Ocm* (oncomodulina, proteína citoplasmática que capta iones de calcio), *Slc26a5* (prestina, proteína motora asociada a la membrana de las CCEs), *Gfi1* (factor de transcripción de las células ciliadas) y *Ptprq* (proteína requerida para la maduración del penacho de estereocilios). La drástica disminución en los niveles de expresión de estos genes, detectada tanto en ratones Dmdo/Dmdo como en Dmdo/+, no está presente en otros modelos murinos que cursan con degeneración de las células ciliadas. Esto indica que la reducción en los niveles de los mRNAs de estos genes, observada en los ratones disminuyendo es debida específicamente a la presencia de la forma madura mutada del miR-96 y no secundaria a la degeneración de las células ciliadas.

En cualquier caso, el efecto de la presencia de las formas mutantes es la alteración de la expresión génica en las células en las que se expresa este miRNA: las células ciliadas. La alteración del patrón de expresión génico que hace que la célula cambie sus características y su identidad, subyace al desarrollo de múltiples enfermedades como el cáncer en donde las células se duplican sin control (Kloosterman y Plasterk 2006; Wang y cols. 2009), ciertas enfermedades autoinmunes (Sonkoly y Pivarcsi 2009) y algunas neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA) o la enfermedad de Parkinson (EP). Tanto la EA como la EP son enfermedades complejas y multifactoriales causadas por la acumulación de una proteína: la proteína beta-amiloide en el caso de la EA y la alfa-sinucleína en el caso de la EP. Los miRNAs podrían estar implicados en la patogénesis de ambas enfermedades ya que se han encontrado señales para algunos de estos reguladores en los mRNAs de estas proteínas (Nelson y cols. 2008; Junn y cols. 2009).

## **2. Características fenotípicas asociadas a las mutaciones en miR-96**

Los individuos que presentan hipoacusia asociada a la presencia de la mutación miR-96+13G>A se diferencian en ciertas características fenotípicas de los que portan la mutación miR-96+14C>A. Aunque en ambos casos la hipoacusia es progresiva, difieren en la edad de aparición, en el rango de frecuencias que están afectadas y en la velocidad de progresión de la hipoacusia. Las diferencias observadas podrían deberse al fondo genético asociado a cada una de las mutaciones, pero dentro de las familias este fondo no se mantiene constante en todas las generaciones ni en todas las ramas ya que no hay matrimonios consanguíneos. El mecanismo patogénico de ambas mutaciones es compartido: disminución de la cantidad de miR-96 maduro y menor capacidad de silenciamiento de las formas mutantes sobre las dianas directas de miR-96, y posiblemente, silenciamiento de mRNAs diana adquiridos. Como ambos mutantes de miR-96 se comportan de manera similar para las diferentes dianas directas analizadas en los ensayos de luciferasa, presumiblemente compartan un amplio catálogo de dianas desreguladas. Por otro lado, cada forma mutante podría provocar la desregulación de mRNAs diana exclusivos. Esto daría lugar a un patrón de expresión génica distinto en cada caso que afectaría de manera diferencial al mantenimiento y función de las células ciliadas. Las pequeñas variaciones en el subgrupo de dianas desreguladas como consecuencia de aquellas específicamente adquiridas para cada mutación podrían contribuir a las sutiles diferencias fenotípicas observadas en estas dos familias.

Tanto en las dos familias con hipoacusia DFNA50 como en el ratón *diminuendo*, la pérdida de audición es no sindrómica, a pesar de que este miRNA se expresa en otros tejidos. De hecho miR-96 forma parte de un *cluster* junto con miR-182 y miR-183, muy conservado evolutivamente (Pierce y cols. 2008). Su expresión conjunta es específica de células sensoriales (células ciliadas) de diferentes órganos como retina, cóclea, papilas gustativas y epitelio olfativo en ratón, y oído y neuromastomas en pez cebra. (Wienholds y cols. 2005; Weston y cols. 2006; Xu y cols. 2007). Puesto que esta familia de miRNAs se expresa en retina se realizaron estudios oftalmológicos a los afectados con sordera DFNA50 pero no se detectaron anomalías oculares en ninguno de ellos. Por otro lado en el trabajo de Jin y colaboradores en el que se analiza el efecto de la ausencia del miR-182 en el desarrollo de la retina de ratón, los autores encuentran que a pesar de la abundante expresión del miR-182 en este tejido, su desaparición no tiene ninguna consecuencia en el desarrollo, mantenimiento y supervivencia de las células que lo componen, al menos a la

edad a la que se han analizado los ratones (P3), y concluyen que la presencia del miR-182 no parece ser determinante para el desarrollo y la funcionalidad de la retina (Jin y cols. 2009). Esto podría indicar que el miR-182 está siendo sustituido en sus funciones por alguno de los otros dos miembros de esta familia, miR-96 y miR-183, cuyas regiones *seed* difieren en una única base. El mismo argumento sería válido para explicar la ausencia de alteraciones oftalmológicas en las familias con sordera DFNA50 estudiadas: el miR-96 mutado podría estar siendo sustituido en retina por cualquiera de los otros dos miembros del clúster, miR-182 y miR-183; aunque también existe la posibilidad de que las dianas específicas de miR-96 que se expresan en la retina no sean críticas para su función o bien que la presencia de las formas mutadas no provoque una alteración patogénica de los niveles de expresión de dichas dianas.

En cuanto a las características de la sordera en los ratones *diminuendo*, el portador en heterocigosis de la mutación (*Dmdo/+*) presenta una sordera postnatal y progresiva al igual que los sujetos portadores de las mutaciones miR-96+13G>A y miR-96+14C>A. Por tanto, las alteraciones cocleares que se observen en estos ratones podrían ser un reflejo de las que se estarían dando en los sujetos con sordera DFNA50. El estudio de las cócleas de los ratones mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) reveló que las alteraciones que presentan las células ciliadas en estos ratones son leves en el inicio, siendo indistinguibles del silvestre a una edad de 5 días (P5). A medida que pasa el tiempo el penacho de esterocilios va degenerando: los esterocilios cambian de tamaño y la forma típica del penacho de esterocilios tanto de células ciliadas externas como internas se pierde. A las cuatro semanas, se puede observar una degeneración masiva de las células ciliadas externas en las espiras, basal y media aunque la mayoría de las células ciliadas internas sobreviven. Los homocigotos para la mutación *Dmdo* presentan un fenotipo más grave que los heterocigotos; a la deficiencia auditiva que aparece desde el nacimiento, se añaden problemas vestibulares que se manifiestan en deambulación en círculos y movimientos involuntarios de cabeza. Las alteraciones que se observan mediante MEB en ratones P5 homocigotos (*Dmdo/Dmdo*) corresponden a las que se pueden observar en heterocigotos a las cuatro semanas; pasado ese tiempo, en las cócleas de los ratones homocigotos no quedan prácticamente células ciliadas. De estos resultados se desprende que la gravedad del fenotipo observado es dependiente de la dosis de miR-96 silvestre o bien de la dosis de miR-96 mutado ya que en el ratón *diminuendo* no se ha visto disminución en la cantidad de la forma madura mutada del miR-96.

En cualquier caso, los miRNAs son imprescindibles para la morfogénesis, la diferenciación y el mantenimiento de las estructuras, así como para el buen funcionamiento del oído interno. Así se demuestra en los trabajos en los que se describen ratones knock out condicionales de Dicer en el oído. En uno de los modelos, la enzima Dicer se anula en la etapa embrionaria temprana, una vez formada la placoda ótica; lo que provoca, además de letalidad en el periodo embrionario tardío (E18.5), una profunda malformación del oído interno y un desarrollo pobre de la innervación aferente y eferente (Soukup y cols. 2009). En el ratón Dicer PCKO (Friedman y cols. 2009) se observan cambios en la morfología del penacho de estereocilios, en la estructura de los estereocilios, y la degeneración de las células ciliadas. Este ratón ha sido generado mediante la expresión de la recombinasa Cre bajo el promotor del gen *Pou4f3* y rodeando al gen *Dicer-1* con señales *lox-p* que reconoce dicha recombinasa. El factor de transcripción Pou4f3, dentro del oído interno, es exclusivo de células ciliadas y de soporte en la cóclea y de células ciliadas en el vestíbulo. Comienza a expresarse en el momento del desarrollo en el que el oído ya está formado y las estructuras comienzan a diferenciarse. La similitud en los defectos morfológicos que se observan en el ratón disminuyendo y el Dicer PCKO indica que la pérdida auditiva y la afectación vestibular están asociadas a una disfunción y posterior degeneración de las células ciliadas tanto en cóclea como en vestíbulo y además, que el miR-96 y los otros dos miembros de la familia miR-182 y miR-183, deben ser fundamentales en la diferenciación de las células ciliadas y el mantenimiento de la estructura del penacho de estereocilios. Otro dato que apoya que los defectos morfológicos observados en ambos ratones están producidos por la ausencia, en un caso, y el mal funcionamiento, en otro, de los miRNAs de la familia del miR-183 es que, en ambos casos, existe un gradiente de degeneración celular que coincide con el patrón de expresión que presenta el miR-182 (Weston y cols. 2006). A pesar de que la expresión del miR-96 (Sacheli y cols. 2009) y del gen *Pou4f3* (Xiang y cols. 1998) comienza en el mismo momento (E12.5) y en los mismos tipos celulares, en el ratón disminuyendo (Dmdo/Dmdo) las alteraciones morfológicas se observan en ratones recién nacidos, mientras que en los ratones Dicer PCKO las alteraciones se manifiestan más tardíamente. Este retraso en la aparición del fenotipo es debido, posiblemente, a que existen cantidades residuales de proteína Dicer y/o de miRNAs que continúan realizando sus funciones. En cuanto a las alteraciones vestibulares que se observan en el Dicer PCKO, son más leves que en el ratón disminuyendo (Dmdo/Dmdo) ya que en el primero sólo se observan malformaciones del penacho de estereocilios, mientras que en el ratón disminuyendo se produce una fuerte degeneración de las células ciliadas tanto

en los homocigotos (Dmdo/Dmdo), como en los heterocigotos (+/Dmdo), en los que la muerte celular comienza a hacerse patente a partir de la cuarta semana de vida. La ausencia de síntomas vestibulares en los individuos con hipoacusia de las familias en estudio, plantea la posibilidad de que las mutaciones halladas en humano no tengan el mismo comportamiento que la encontrada en ratón o que, al igual que ocurre en la retina existan en el vestibulo, en humano, mecanismos que compensen las alteraciones producidas por las formas mutantes de miR-96. Otra explicación sería que las funciones que el miR-96 lleva a cabo en el vestibulo sean diferentes en humano y en ratón. También en otros tipos de sordera los modelos de ratón manifiestan síntomas de disfunción vestibular que no están presentes en humano. El ratón KO del gen *Pou4f3* o los ratones *shaker 2* y *snell's waltzer*, mutantes para los genes *Myo6* y *Myo15a* respectivamente presentan síntomas vestibulares acompañando a la hipoacusia que no aparecen como característica fenotípica de las sorderas asociadas a mutaciones en estos genes en humano (Friedman Dror y Avraham 2007).

Este trabajo es una muestra más de la gran heterogeneidad que presenta la hipoacusia tanto desde el punto de vista clínico como genético y que es un reflejo de la complejidad estructural y funcional del sistema auditivo de mamíferos. Esta complejidad tiene como base la enorme cantidad de genes cuyos productos participan en el proceso auditivo. Muchos de ellos se han localizado gracias a su implicación en casos hereditarios de sordera. En el presente estudio, al igual que en la gran mayoría de los genes asociados a sordera que se conocen en la actualidad, se ha utilizado el abordaje clásico mediante el análisis de ligamiento en un caso familiar de hipoacusia hereditaria para mapear el nuevo *locus* DFNA50 e identificar el gen responsable. Hasta ahora, la mayoría de los genes asociados a los diferentes tipos de pérdida auditiva que han sido identificados codifican proteínas. Sin embargo, en el caso del DFNA50 el defecto genético se ha identificado en un gen que no codifica un producto proteico sino que da lugar a un RNA con función reguladora, un miRNA denominado miR-96.

Los miRNAs, o más bien alteraciones tanto en los niveles de expresión como mutaciones en sus genes diana, han sido asociados a una gran variedad de patologías, todas ellas multifactoriales, que abarcan desde infarto de miocardio a diversos tipos de cáncer (Clop y cols. 2006; Beetz y cols. 2008; Garzon y cols. 2009; Calin y cols. 2009; Soifer, Rosi y Sætrom 2007). La principal novedad que aporta este trabajo es que, por primera vez, mutaciones que afectan a la secuencia madura de un miRNA están implicadas

en la patotogénesis de un trastorno monogénico de herencia mendeliana. Además y también por primera vez se ha encontrado en ratón, una mutación en el gen ortólogo a miR-96 que causa la pérdida auditiva en los ratones portadores de dicha mutación (Lewis y cols. 2009).

Todos los datos presentados ponen de manifiesto la gran importancia del miR-96 en la diferenciación y, sobre todo, en el mantenimiento de la función de las células ciliadas necesaria para una correcta audición. Pero es necesario seguir indagando sobre el mecanismo de patogénesis de las mutaciones descritas y encontrar cuáles son los genes diana que están desregulados en cada caso. Sólo así, conociendo qué redes moleculares están afectadas, se podrán diseñar métodos terapéuticos eficaces que permitan evitar la aparición o, al menos la evolución, de la pérdida auditiva en los portadores de estas mutaciones.

## **CONCLUSIONES**





Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. Hemos mapeado un nuevo *locus* de sordera neurosensorial no sindrómica de herencia autosómica dominante: DFNA50. El *locus* se sitúa en el brazo largo del cromosoma 7, en la banda cromosómica 7q32, dentro del intervalo genético de 3.8cM delimitado por los marcadores D7S1875 y D7S2519.
2. Hemos identificado al miR-96, un miRNA que se expresa en las células ciliadas del oído interno, como gen asociado a la sordera DFNA50. El miR-96 es el primer miRNA que se asocia a sordera, y lo que es más destacable, es también el primero que se asocia a una enfermedad monogénica de herencia mendeliana. La mutación identificada, miR-96+13G>A, altera la secuencia de la región *seed* del miR-96 maduro, que es la responsable de la especificidad del reconocimiento de las secuencias diana.
3. La búsqueda de mutaciones en los genes que dan lugar al clúster de miRNAs, miR-96, miR-182 y miR-183, en las familias no diagnosticadas de la colección de familias de la Unidad nos ha permitido identificar una nueva mutación patogénica en el miR-96: una transversión C por A, miR96+14C>A, que afecta a la base contigua a la mutación ya descrita y que también altera la región *seed* de la forma madura del miR-96.
4. Las mutaciones miR-96+13G>A y miR-96+14C>A tienen un efecto negativo sobre la eficacia del proceso de maduración del miR-96 ya que la cantidad de la forma maduras portadora de cada mutación está disminuida alrededor de un 80% con respecto a la forma madura silvestre en los ensayos *in vitro* realizados.
5. Las mutaciones identificadas resultan en una disminución significativa de la capacidad de silenciamiento de las formas mutantes miR-96+13G>A y miR-96+14C>A sobre los mRNAs diana ensayados. Esto supone la alteración del patrón de expresión génica de las células en las que se expresa el miR-96 que conduciría, en este caso, a la pérdida de la funcionalidad de las células ciliadas de la cóclea y por tanto el desarrollo de la sordera en los individuos portadores de dichas mutaciones.



## **BIBLIOGRAFÍA**



**Bibliografía**

- Aleman, LM, Doench, J, and Sharp, PA. Comparison of siRNA induced off-target RNA and protein effects. *RNA*. 2007 Mar; 13(3): 385-95.
- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 2003 Mar; 9(3): 277-9.
- Bartel, DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009 Jan 23; 136(2): 215-33.
- Beetz C, Schüle R, Deconinck T, Tran-Viet KN, Zhu H, Kremer BP, Frints SG, van Zelst-Stams WA, Byrne P, Otto S, Nygren AO, Baets J, Smets K, Ceulemans B, Dan B, Nagan N, Kassubek J, Klimpe S, Klopstock T, Stolze H, Smeets HJ, Schrandt-Stumpel CT, Hutchinson M, van de Warrenburg BP, Braastad C, Deufel T, Pericak-Vance M, Schöls L, de Jonghe P, Züchner S. REEP1 mutation spectrum and genotype/phenotype correlation in hereditary spastic paraplegia type 31. *Brain*. 2008 Apr; 131(Pt 4): 1078-86.
- Berezikov, E, Cuppen, E, Plasterk, RH. Approaches to microRNA discovery. *Nat Genet*. 2006 Jun; 38 Suppl: S2-7.
- Bom SJ, Kunst HP, Huygen PL, Cremers FP, Cremers CW. Non-syndromal autosomal dominant hearing impairment: ongoing phenotypical characterization of genotypes. *Br J Audiol*. 1999 Oct; 33(5): 335-48.
- Bykhovskaya Y, Estivill X, Taylor K, Hang T, Hamon M, Casano RA, Yang H, Rotter JJ, Shohat M, Fischel-Ghodsian N. Candidate locus for a nuclear modifier gene for maternally inherited deafness. *Am J Hum Genet*. 2000 Jun; 66(6):1905-10.

- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. 2002 Proc Natl Acad Sci U S A. Nov 26; 99(24):15524-9.
- Carthew, RW, Sontheimer, EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell. 2009 Feb 20; 136(4): 642-55.
- Catalucci D, Latronico MV, Condorelli G. MicroRNAs control gene expression: importance for cardiac development and pathophysiology. Ann N Y Acad Sci. 2008 Mar; 1123: 20-9.
- Chakarova C, Wehnert MS, Uhl K, Sakthivel S, Vosberg HP, van der Ven PF, Fürst DO. Genomic structure and fine mapping of the two human filamin gene paralogues *FLNB* and *FLNC* and comparative analysis of the filamin gene family. Hum Genet. 2000 Dec; 107(6): 597-611.
- Chen Z, Pasquini M, Hong B, DeHart S, Heikens M, Tsai S. The human *Penumbra* gene is mapped to a region on chromosome 7 frequently deleted in myeloid malignancies. Cancer Genet Cytogenet. 2005 Oct 15; 162(2): 95-8.
- Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C, Georges M. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. Nat Genet. 2006 Jul; 38(7): 813-8.
- Denko N, Schindler C, Koong A, Laderoute K, Green C, Giaccia A. Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment. Clin Cancer Res. 2000 Feb; 6(2): 480-7.

- Denti MA, Rosa A, Sthandier O, De Angelis FG, Bozzoni I. A new vector, based on the PolIII promoter of the U1 snRNA gene, for the expression of siRNAs in mammalian cells. *Mol Ther*. 2004 Jul; 10(1): 191-9.
- Dib C, Fauré S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*. 1996 Mar 14; 380(6570): 152-4.
- Duan R, Pak C, Jin P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Hum Mol Genet*. 2007 May 1; 16(9): 1124-31.
- Engels BM, Hutvagner G. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene*. 2006 Oct 9; 25(46): 6163-9.
- Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol*. 2003; 5(1): R1.
- Eulalio A, Tritschler F, Izaurralde E. The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA*. 2009 Aug; 15(8):1433-42.
- Finley D, Chau V. Ubiquitination. *Annu Rev Cell Biol*. 1991; 7: 25-69.
- Finsterer J, Fellingner J. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2005 May; 69(5): 621-47.
- Friedman TB, Griffith AJ. Human nonsyndromic sensorineural deafness. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2003; 4: 341-402.

- Friedman LM, Dror AA, Avraham KB. Mouse models to study inner ear development and hereditary hearing loss. *Int J Dev Biol.* 2007; 51(6-7): 609-31.
- Friedman LM, Dror AA, Mor E, Tenne T, Toren G, Satoh T, Biesemeier DJ, Shomron N, Fekete DM, Hornstein E, Avraham KB. MicroRNAs are essential for development and function of inner ear hair cells in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 May 12; 106(19): 7915-20.
- Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cáncer. *Annu Rev Med.* 2009; 60: 167-79.
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 1; 34
- Hammond KL, Loynes HE, Folarin AA, Smith J, Whitfield TT. Hedgehog signalling is required for correct anteroposterior patterning of the zebrafish otic vesicle. *Development.* 2003 Apr; 130(7): 1403-17.
- Heikens MJ, Cao TM, Morita C, Dehart SL, Tsai S. Penumbra encodes a novel tetraspanin that is highly expressed in erythroid progenitors and promotes effective erythropoiesis. *Blood.* 2007 Apr 15; 109(8): 3244-52.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem.* 1992; 61: 761-807.
- Hudspeth AJ. How the ear's works work. *Nature.* 1989 Oct 5; 341(6241):397-404.
- Ivan M. The ongoing microRNA revolution and its impact in biology and medicine. *J Cell Mol Med.* 2008 Sep-Oct; 12(5A): 1425.
- Jentsch S. Ubiquitin-dependent protein degradation: a cellular perspective. *Trends Cell Biol.* 1992 Apr; 2(4): 98-103.



- Jin ZB, Hirokawa G, Gui L, Takahashi R, Osakada F, Hiura Y, Takahashi M, Yasuhara O, Iwai N. Targeted deletion of miR-182, an abundant retinal microRNA. *Mol Vis*. 2009; 15: 523-33.
- John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PloS Biol*. 2004 Nov; 2(11): e363.
- Jung DH, Mo SH, Kim DH. Calumenin, a multiple EF-hands Ca<sup>2+</sup>-binding protein, interacts with ryanodine receptor-1 in rabbit skeletal sarcoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Apr 28; 343(1): 34-42.
- Junn E, Lee KW, Jeong BS, Chan TW, Im JY, Mouradian MM. Repression of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 4; 106(31): 13052-7.
- Kalatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet*. 1998; 7(10): 1589-97.
- Karet FE, Finberg KE, Nelson RD, Nayir A, Mocan H, Sanjad SA, Rodriguez-Soriano J, Santos F, Cremers CW, Di Pietro A, Hoffbrand BI, Winiarski J, Bakkaloglu A, Ozen S, Dusunsel R, Goodyer P, Hulton SA, Wu DK, Skvorak AB, Morton CC, Cunningham MJ, Jha V, Lifton RP. Mutations in the gene encoding B1 subunit of H<sup>+</sup>-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat Genet*. 1999 Jan; 21(1): 84-90.
- Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*. 2006 Oct; 11(4): 441-50.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001 Oct 26; 294(5543):853-8.

- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002 Apr 30; 12(9): 735-9.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. *RNA*. 2003 Feb; 9(2): 175-9.
- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. Multilocus linkage analysis in humans: detection of linkage and estimation of recombination. *Am J Hum Genet*. 1985 May; 37(3): 482-98.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001 Oct 26; 294(5543): 858-62.
- Lau PW, MacRae IJ. The molecular machines that mediate microRNA maturation. *J Cell Mol Med*. 2009 Jan; 13(1): 54-60.
- Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001 Oct 26; 294(5543): 862-4.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3; 75(5): 843-54.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005 Jan 14; 120(1): 15-20.
- Lewis MA, Quint E, Glazier AM, Fuchs H, De Angelis MH, Langford C, van Dongen S, Abreu-Goodger C, Piipari M, Redshaw N, Dalmay T, Moreno-Pelayo MA, Enright AJ, Steel KP. An ENU-induced mutation of miR-96 associated with progressive hearing loss in mice. *Nat Genet*. 2009 May; 41(5): 614-8.

- Li W, Duan R, Kooy F, Sherman SL, Zhou W, Jin P. Germline mutation of microRNA-125a is associated with breast cancer. *J Med Genet.* 2009 May; 46(5): 358-60.
- Liu W, Li G, Chien JS, Raft S, Zhang H, Chiang C, Frenz DA. Sonic Hedgehog regulates otic capsule chondrogenesis and inner ear development in the mouse embryo. *Dev Biol.* 2002 Aug 15; 248(2): 240-50.
- Lomax MI, Huang L, Cho Y, Gong TL, Altschuler RA. Differential display and gene arrays to examine auditory plasticity. *Hear Res.* 2000 Sep; 147(1-2): 293-302.
- Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. *Am J Med Genet.* 1993 Jun 15; 46(5): 486-91.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11; 16(3): 1215.
- Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci.* 1991; 630: 16-31.
- Morton CC. Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. *Hum Mol Genet.* 2002 May 15; 11(10): 1229-40.
- Neilson JR, Sharp PA. Small RNA regulators of gene expression. *Cell.* 2008 Sep 19; 134(6): 899-902.
- Nelson PT, Wang WX, Rajeev BW. MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol.* 2008 Jan; 18(1): 130-8.

- Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet.* 2007 May; 23(5): 243-9.
- Nybakken K, Perrimon N. Hedgehog signal transduction: recent findings. *Curr Opin Genet Dev.* 2002 Oct; 12(5): 503-11.
- Ospeck M, Dong XX, Fang J, Iwasa KH. Electromotility in outer hair cells: a supporting role for fast potassium conductance. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2006; 68(6): 373-7.
- Pall GS, Codony-Servat C, Byrne J, Ritchie L, Hamilton A. Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(8): e60.
- Petersen MB. Non-syndromic autosomal-dominant deafness. *Clin Genet.* 2002 Jul; 62(1): 1-13.
- Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nat Genet.* 1996 Dec; 14(4): 385-91.
- Petit C, Levilliers J, Hardelin JP. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet.* 2001; 35: 589-646.
- Pierce ML, Weston MD, Fritsch B, Gabel HW, Ruvkun G, Soukup GA. MicroRNA-183 family conservation and ciliated neurosensory organ expression. *Evol Dev.* 2008 Jan-Feb; 10(1): 106-13.
- Prag S, Adams JC. Molecular phylogeny of the kelch-repeat superfamily reveals an expansion of BTB/kelch proteins in animals. *BMC Bioinformatics.* 2003 Sep 17; 4: 42.

- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000 Feb 24; 403(6772): 901-6.
- Riazuddin S, Castelein CM, Ahmed ZM, Lalwani AK, Mastroianni MA, Naz S, Smith TN, Liburd NA, Friedman TB, Griffith AJ, Riazuddin S, Wilcox ER. Dominant modifier DFNM1 suppresses recessive deafness DFNB26. *Nat Genet*. 2000 Dec; 26(4):431-4.
- Riccomagno MM, Martinu L, Mulheisen M, Wu DK, Epstein DJ. Specification of the mammalian cochlea is dependent on Sonic hedgehog. *Genes Dev*. 2002 Sep 15; 16(18): 2365-78.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 2004 Oct; 14(10A): 1902-10.
- Sacheli R, Nguyen L, Borgs L, Vandenbosch R, Bodson M, Lefebvre P, Malgrange B. Expression patterns of miR-96, miR-182 and miR-183 in the development inner ear. *Gene Expr Patterns*. 2009 Jun; 9(5): 364-70.
- Saigoh K, Wang YL, Suh JG, Yamanishi T, Sakai Y, Kiyosawa H, Harada T, Ichihara N, Wakana S, Kikuchi T, Wada K. Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat Genet*. 1999 Sep; 23(1): 47-51.
- Smith RJH, VanCamp G. Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview (December 2, 2008). In: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2009. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed, Dec.09

- Soifer HS, Rossi JJ, Sætrom P. MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications. *Mol Ther*. 2007 Dec; 15(12): 2070-9.
- Sonkoly E, Pivarsci A. Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases. *J Cell Mol Med*. 2009 Jan; 13(1): 24-38.
- Soukup GA, Fritzscht B, Pierce ML, Weston MD, Jahan I, McManus MT, Harfe BD. Residual microRNA expression dictates the extent of inner ear development in conditional Dicer knockout mice. *Dev Biol*. 2009 Apr 15; 328(2): 328-41.
- Soukup GA. Little but loud: small RNAs have a resounding affect on ear development. *Brain Res*. 2009 Jun 24; 1277: 104-14.
- Stover EH, Borthwick KJ, Bavalia C, Eady N, Fritz DM, Rungroj N, Giersch AB, Morton CC, Axon PR, Akil I, Al-Sabban EA, Baguley DM, Bianca S, Bakaloglu A, Bircan Z, Chauveau D, Clermont MJ, Guala A, Hulton SA, Kroes H, Li Volti G, Mir S, Mocan H, Nayir A, Ozen S, Rodriguez Soriano J, Sanjad SA, Tasic V, Taylor CM, Topaloglu R, Smith AN, Karet FE. Novel *ATP6V1B1* and *ATP6V0A4* mutations in autosomal recessive distal renal tubular acidosis with new evidence for hearing loss. *J Med Genet*. 2002 Nov; 39(11): 796-803.
- Tekin M, Arnos KS, Pandya A. Advances in hereditary deafness. *Lancet*. 2001 Sep 29; 358(9287): 1082-90.
- Togashi A, Katagiri T, Ashida S, Fujioka T, Maruyama O, Wakumoto Y, Sakamoto Y, Fujime M, Kawachi Y, Shuin T, Nakamura Y. Hypoxia-inducible protein 2 (HIG2), a novel diagnostic marker for renal cell carcinoma and potential target for molecular therapy. *Cancer Res*. 2005 Jun 1; 65(11): 4817-26.

- Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. URL: <http://webho1.ua.ac.be/hhh/> Jan. 2009.
- van Dongen S, Abreu-Goodger C, Enright AJ. Detecting microRNA binding and siRNA off-target effects from expression data. *Nat Methods*. 2008 Dec; 5(12): 1023-5.
- Vorgerd M, van der Ven PF, Bruchertseifer V, Löwe T, Kley RA, Schröder R, Lochmüller H, Himmel M, Koehler K, Fürst DO, Huebner A. A mutation in the dimerization domain of filamin c causes a novel type of autosomal dominant myofibrillar myopathy. *Am J Hum Genet*. 2005 Aug; 77(2): 297-304.
- Wang QJ, Lu CY, Li N, Rao SQ, Shi YB, Han DY, Li X, Cao JY, Yu LM, Li QZ, Guan MX, Yang WY, Shen Y. Y-linked inheritance of non-syndromic hearing impairment in a large Chinese family. *J Med Genet*. 2004 Jun; 41(6): e80.
- Wang Y, Lee CG. MicroRNA and cáncer—focus on apoptosis. *J Cell Mol Med*. 2009 Jan; 13(1): 12-23.
- Weston MD, Pierce ML, Rocha-Sanchez S, Beisel KW, Soukup GA. MicroRNA gene expression in the mouse inner ear. *Brain Res*. 2006 Sep 21; 1111(1): 95-104.
- Weston MD, Soukup GA. MicroRNAs sound off. *Genome Med*. 2009 Jun 8; 1(6): 59.
- Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RH. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*. 2005 Jul 8; 309(5732): 310-1.

- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993 Dec 3; 75(5): 855-62.
- Willems PJ. Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med*. 2000 Apr 13; 342(15): 1101-9.
- Xiang M, Gao WQ, Hasson T, Shin JJ. Requirement for Brn-3c in maturation and survival, but not in fate determination of inner ear hair cells. *Development*. 1998 Oct; 125(20): 3935-46.
- Xu S, Witmer PD, Lumayag S, Kovacs B, Valle D. MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *J Biol Chem*. 2007 Aug 24; 282(34): 25053-66.
- Yabe D, Nakamura T, Kanazawa N, Tashiro K, Honjo T. Calumenin, a Ca<sup>2+</sup>-binding protein retained in the endoplasmic reticulum with a novel carboxyl-terminal sequence, HDEF. *J Biol Chem*. 1997 Jul 18; 272(29): 18232-9.
- Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J*. 2005 Jan 12; 24(1):138-48.
- Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene*. 2006 Oct 9; 25(46): 6156-62.
- Zhang XM, Sheng SR, Wang XY, Bin LH, Wang JR, Li GY. Expression of tumor related gene *NAG6* in gastric cancer and restriction fragment length polymorphism analysis. *World J Gastroenterol*. 2004 May 1; 10(9): 1361-4.
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jul 1; 31(13): 3406-15.



**ANEXOS**



**ANEXO1**

Genes candidatos secuenciados para el DFNA50

<b>UBE2H</b>			
<b>Exón n°</b>	<b>Oligonucleótido directo (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Oligonucleótido reverso (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
1	TGTTGCCACCTCCACCGA	CCCACACACAGCCCGAATT	197
2	ATATGCCTGGGGTGTATTGGTAA	GAAAGATTTCTCACTGGTTCTGC	293
3	AATTTGGAGATGTAGTTCTGATGAA	TTAACCAAAGCCAAAAAAGGA	252
4	TCTCTGGATACTTTTTGCTGCTAA	TTTGGATTCTATCATTTACATGACC	230
5	AATTGGGATTCTTTTTTTCACAGA	TCCCATTACCAACAAAACATCTTA	283
6	CATGTAATAGAGCACACTCGTATGG	ATTTAAGTTCTTTTGTCTCCAGGTT	311
7	CTATGGGATTCTCCTTAGCTGTA	GAATATTATAGTCTGCTTCTCATGG	357
<b>SMOH</b>			
<b>Exón n°</b>	<b>Oligonucleótido directo (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Oligonucleótido reverso (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
1 <sup>a</sup>	CCGGGGCTTTTGCTGAGTT	GCCCAGGCACACGTTGTAGC	272
1b	AGGAGCGCGGGGTGACT	CCCGCCCTCTCCAAACTCA	286
2	TGGGCTGCAGTGTGGCAA	CCTGCCCAACCCAGAGAGC	352
3	CGTCCCTGAGCTGCCTTGAC	TGGCTCTCTTCCCACGTTCC	316
4	TGTGTCAGCAGAATAACCCTAACC	TCAGCCTTCCTCCCTGTACCTT	274
5	GGAGTACAGAGTGACCGCCTCA	GGCCCCCTCCCTCAAACCT	324
6	AGTGACTGGTAGGAACGGGAGA	GCTAGCTGGGGTTTCAGCAT	324
7	CCCTCCTCCCACTCACCCATC	TGTCCCACTGACTTACTGCATCCT	271
8	CCAGCTGGGTGAACTTTGAGG	GGGTGGAGGTGGGTGTCTTTA	284
9	CTAGCCTGGGTGACAGAGCAAGA	GACCCGACAAAACCTAAAGATGG	356
10	GGCCCTTCCCAAGATTTGATG	CCTCACAGTCGGTCTTCCAAATAA	328
11	GGAAGATGAATGGCACTGACTATG	CCTGTACTCCAGTCCAGAAGC	297
12 <sup>a</sup>	GGGGGTGGCATGGACAGA	TGGGCAGAATGGGTGGAG	338
12b	CAGCTGCCCCGGCAGAAA	GCATGCTCGGTGAGGAAGAAGAG	324
<b>CALU</b>			
<b>Exón n°</b>	<b>Oligonucleótido directo (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Oligonucleótido reverso (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
1	CGGGTTTGCTGATGATTGGT	GGGACAGAAAGAAAGCGAATAAAG	218
2	CGGATGTGAGCTTTTAATTTCTTAT	AATTAAAAATGTATGAAATCAGGCA	495
3	TGTCTTTTAACTTTTGCTGGATT	CTTTCCTTTACTGTGTGACCCATTT	582
4	TTCCACCCACACATTTTCA	GGGAAAGACAGAATAAGCCACAAAA	303
5	AATTGCTCATGTTTTACCATTTCTT	CCCAGCCAGCAAATACACCT	329
6	AAAAGGGTTAGGCCAGATTAGCA	CTTTTCTGAAGCCAAATTTCTTACA	517
7	TCGTATGTATGTAGGGGGAATGAG	CATGTGAAACCAGAAGCTGTAAAAA	328

<i>ATP6V1F</i>			
Exón nº	Oligonucleótido directo (Secuencia 5'→3')	Oligonucleótido reverso (Secuencia 5'→3')	Tamaño (pb)
1	TGGAGGCCGTGTTGCTGTT	GCGGAAGGACTTTCAGGATCG	429
2	GCCCAGCCCAACAACCTCG	ATGTCCTTTCCAGCACCCAAC	589
<i>NAG6</i>			
Exón nº	Oligonucleótido directo (Secuencia 5'→3')	Oligonucleótido reverso (Secuencia 5'→3')	Tamaño (pb)
1	CGAGAGAAATGGGAGGAGAGG	AAAGAAGGGAATTAAGGGAGGA	595
2	GCCCTGGCATAGTGAGTTTG	GATCCAGGGGAGTGCAGAG	402
3	AGCTGGTGGCAGAACTGGA	GGATGGAGAGACAAGGAGAGGA	408
4	CATGATGCTACACTTCTCTGATGG	CACGCCTGGACCCCTACA	622
5	CAGCTATTGGGAAGAGGAGAAAAG	ATCCCCATGTCTGCTTGTAGGT	490
6	GGCCTAAAAATGAAGGTATCAGG	GGCGCTCTTTGACTGGAAG	417
7	GCACAGAGGGTGGGGAAG	TGCAGGGCAAGAGTCAGC	488
8	TGTCTGCATCTGAAAAGGAACC	CTGCCTATGTGGTTGCTGGA	366
9	CAGCAACCACATAGGCAGCAC	TACCATTCCCTCTCGTCCTCTG	450
10	TGAGAAGGACAAGGGAAGATGG	TGCCTTCACTTTTGCCTCTGT	370
11	AGGATCACAAGAGGCAGGAGAG	GAGCTTTTTGGTTTGGGGAGA	448
12	TGAGATTCTTCAGGGAATTGTTTAC	CCTCTTAATGGAGCCTGTGAGTG	508
13 <sup>a</sup>	AGGTGTGCCATTCTCTAAGGTGT	GCTGCTGGTCTGGGTGCT	431
13b	ACCAGCACCCAGACCAGCA	GAGGAAACGGACTGAATCTTATGG	446
14	TGCTCCTCAGGGTGCTATTGTT	CCCTGCTTTGTCCCTCTCTTTAG	361
15	TTGCATAACCAGCCAACCTCTG	TTAAGATGGGAACCACTGTAGACA	477
16	GTCATGAGATTAGGAGCTTCACAGG	GCCCATGATTTTCGTGCAGAC	574
17	TTAACCTCTTGATTCTTTCTCTTT	TGCAGTAGCCCAAGGAAAAG	402
18	GATCCACAATGTTTCTGAGGTGT	TCTGAGGCCATCTGCAAGGT	571
<i>TSPAN33</i>			
Exón nº	Oligonucleótido directo (Secuencia 5'→3')	Oligonucleótido reverso (Secuencia 5'→3')	Tamaño (pb)
1	TAACAAGTTATCCCTCACAGAACAGG	AGGATAAATTCCCCCAAAGTGC	443
2	TGGGTCCCAGGAAAGCAGTC	AGACCATGAAGATTTGGCTCCAG	301
3	CCCCTTAACCTTCATCCAACCA	TGCACTGAGGGGTGGACAGC	390
4	CTCATGTGTGGGGCATCTGG	GCTAAACATGGGCAGGAACCTT	264
5	CCGGCTATCTTCCACCATTAGG	CCTTCCCAGAAGCCATTACCTG	364
6	TGGAGCTCAAAGTTTAAGGCTGTG	ATCGGTGAAGCTAGGGGATGG	379
7	AGTCTGCATTTGGCAACTTCCA	TGATCCCCAGGTGCCTTCC	394
8 <sup>a</sup>	TGGCCGCACTGGGAAGAT	GGCAGTGCCTCGGTGAAAAG	516
8b	GTTGCACAGAGAGTTGGGGGTA	GAAGTAAGGGAGGTGGGGAAGAA	415
9	GCGCTGGACTTCGTGGGT	CACGTCTCTGGCACTAACCAAGA	452

<b>KIAA0265</b>			
<b>Exón n°</b>	<b>Oligonucleótido directo (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Oligonucleótido reverso (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
1	GGAGGCTCCGCTGGTTCC	CCTCCCAAGGAAAAGCAAGC	324
2	TTTGCAATGTGTTGTATGTGTCTGA	GTGGCCAACAAGAAACAGGTTTA	307
3	TTAAACTGGTAGGACACCTGTGGAA	GAACCTGGCTTCTCAGACATTTC	325
4	TGCAGGTAGCCATTTGTGAACA	CAAATATTCTAACACCATCCCCAGA	273
5	TGATTTGGAGGTATCTGGTAAGTTT	GGTCAAATGTTAGCACGAAAGAAT	282
6	CCAATTCACATATTGTTAAACGCCTA	GAAAGCATTTTGGGGCACAG	405
7	TGTACCTTCTGCTCAGTTTGTCTG	AGCCCAACAGGTATTTAACTTGACA	320
8	ATATCAGTGTGGTTCCAGTCTTTC	CAGCTGACAGAGGCATAACTATGAA	272
9	ATAGCTTTGGCTCTTTTCCTTTGT	CCTATATCTGGCTTTTTTCTTGCT	285
10	ATTTAAACCCTCTTGATCTCCACAT	AAAACCAATTTACAGAAAGGCATCT	519
<b>HIG2</b>			
<b>Exón n°</b>	<b>Oligonucleótido directo (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Oligonucleótido reverso (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
1	CAATGACTCAAAACCGCACGA	TGGAACGCGAGGCTGCTA	440
2	GCATGCATATCCCCAAAAGG	ACATGTCTAGGTCAGTGTTCACAAA	363
<b>FLNC</b>			
<b>Exón n°</b>	<b>Oligonucleótido directo (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Oligonucleótido reverso (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
1	CCCCCGATAGCCCAAACC	CGGGGCCAGGGTCTTCTC	552
2	AGAGGCCTGACCCAGAGC	GGTAGGGCCTGCCACCAG	541
3-4	AGCTGGTGGGAAGGGGTGTAA	AGGCTGCAGCACGGTGTG	627
5	CTATGGGCTGGTATGTGTGAGC	CCCCATGGTGACACCTTCC	360
6	CCGGAGGTGACTGCCAGAG	GGCCAAGGAGGGTGAGAGG	362
7	CAGCTGCCCCGCTCTCAC	AGGCTGTGAGCACCCTCTGG	423
8	ACCATGTGGGGCTGTGTGG	CCAGCTGTGCTCTTAGGAACTCC	491
9	CCGGTTGTGCTGGGGACA	CCCGTATAGCACTTAGGGTGGAG	506
10	ACAAGTGTCCCTGCCCTGAGT	GGGAGAGAGGGAGCTGGTG	437
11	CCCCCATGCTGTCTCTGTC	CATGTCCTATCTCCCTGCTCACC	402
12-13	GAGCGCTGGGGTGAGCAG	TGGGCCCATGAGTATCAGTCC	650
14	GGTGGCCTCAGTGGCTGGT	CCTGAGCCCAGGGACAACAG	374
15-16	GGACTGAGGCTTGGGCTGGT	CCTCACACAGGTAGGGCTCCAC	610
17-18	AGACATGGTGGAGCCCTACCTG	ACCATGAGAGTGAGGGCAGGAG	655
19-20	TCTGAGCTTCAGAGCCCATATTCA	AGCTAAGTTGTCTCAAGGCAGGT	726
21	CTGGCCTTGGAGTCACACCTG	GGTTTCTGGGCCAGTAAGGACTC	968
22	GGCCCAGGCTCCGATTAGA	CAGCCACAGGGGCATCAAT	494
23	GCAGTACACCGCTACGAGGA	GAGTAGCTGAATGGGGGGACA	550
24	CCCTGTAGCTCGTTTCTCCTCAG	ACTAGGGGGGCTGTCACATCA	492

<b>FLNC (continuación)</b>			
<b>Exón nº</b>	<b>Oligonucleótido directo (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Oligonucleótido reverso (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
25-26	TTCCCATGTTGGTCTGGCTTC	GCGAGACTGGACGAGGCTGA	629
27	CATGTCTATGGGGAGGACTCTGG	GGATCTCATCACCGCCATACTTG	455
28-29	CAGATCTTGGTGAGTCTCTGTGCAT	GGGAGCTGGTGGGCTGGA	598
30	GGCCTCACACTCTTCTCTCTTTCC	GGCCATGCTCTCCTCCCACT	613
31	CAGCTCCATCTCCCCAGAGG	AGCTGCAAGAGAAGGAGTGCTGT	420
32	CAGCTGACGCACCTCTCCTG	TGCCCCAATTGCTGTGTGACC	377
33	TCAGGTGCAAGCCATCTGTCC	GGGCCTCGCCTGGTGTCT	438
34-35	TTATACCTTGGTGGGAAGCAGAC	TGTGTTTTTCAGGCACAAGGAGTG	760
36-37	CCGTGCACCTGGGAGTGG	GGGCCCCAGAATGCGAAT	715
38-39	ACACATCGGTGCCCATCTCTG	GAGGGAAGCGAGGGGTGAG	583
40	GGCCAGAGCCACCTGTC	GGGCCAGTCTGCCAGCAT	412
41-42	AGGCCAGGGCAGGTCTGAG	GTGGCCCCAAGCATCTCCT	699
43	GCGCTGACCACAGAGCCTTT	CCTTCCAAGGTCAGTGCTAAATCC	324
44-45	GTGCACACATAGGGTTGCA	AAGCAGCACCAGACTAGTGG	666
46-48	GTCTGGTGCTGCTTTGCTC	ACAGACACCCACAACACAATG	1909
<b>MIRN129-1</b>			
	<b>Oligonucleótido directo (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Oligonucleótido reverso (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
	GGAGGTGGAGGGGGATTACAG	AGGCCAGAGAGGCTCAGTG	463
<b>MIRN182</b>			
	<b>Oligonucleótido directo (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Oligonucleótido reverso (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
	CTCACTCCTCGATTGAGCTCCAG	GAAGGACCTTGTCGAGTTGC	496
<b>MIRN183-96</b>			
	<b>Oligonucleótido directo (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Oligonucleótido reverso (Secuencia 5'→3')</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
	GAGGCCTTGAGGAGGAGCAG	GGGGGGTAGAGACCGTAGCAG	519

Oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos genómicos que corresponden a los exones y regiones intrónicas flanqueantes indicados en la columna de la izquierda, en cada uno de los genes candidato seleccionados. A la derecha se señala la longitud del amplificado.

**ANEXO 2****Anexo 2A****AQP5** (mRNA: BC032946; Posición de la secuencia diana: 1102-1124)

AGCTGACCACCCGCTGACCAGTGTGAGGCAGGGGCCAGCCCCCTAGCCCCCTGAGCCAAGGGGGAAAAAGAAAAAGTACC  
 TAACACAAGCTTCCTTTTTGACAAACCGGTCTCTTGGCTGAGGAGGAGAGCTGGTCACCCTGGCTGCACAGTTAGAGAG  
 GGGAGAAGGAACCCATGATGGGACTCCTGGGGTAGGGGCCAGGGGCTGGGGTCTGCTGGGGACAGGTCTCTCTGGGACAGA  
 CCTCAGAGATTGTGAATGCA**GTGCCAA**GCTCACAGGCTGCAAGGGCCAGGCCAGAAAAGGGTGGGCCTGCAGCCTGCACCC  
 CCCACCTTCCCCAACCTT**TCCTCAAGAGCTGAAGGGATCC**

**CELSR2** (mRNA: NM\_001408; Posición de la secuencia diana: 9002-9024)

CATGCCCTGCTCCTGCTTGTGCTTTATCCTGCCCCGCTCCCCATCGCCTGCCCCGAGCAGCGACGAAACGTCCATCTGAG  
 GAGCCTGGGCCTTGCCGGGAGGGGTACTCACCCACCTAAGGCCATCTA**GTGCCAA**CTCCCCCCCCACCATTCCCCTCACT  
 GCACTTTGGACCCCTGGGGCCAAACATCTCCAAGACAAAGTTTTTCAGAAAAGAGGAAAAAAGAATTTAAAAAAGGATCTC  
 CACTCTTCATGACTTCAGGGATTCATTTTTTTTATACGCTGGAAATTGACTCCCCCTTCCCTTCCCAAAGAGGATAGGACC  
 TCCCAGGATGCTTCCCAGCCTCTCCTCAGTTTCCCATCTGCTGTGCCTCTGGGAGGAGAGGACTCCTGGGGGGCCTGCC  
 CTCATACGCCATCACAAAAGGAAAGGACAAAGCCACACGCAGCCAGGGCTTCACACCCCTCAGGCTGCACCCGGGCAGGC  
 CT**CAGAACGGTGAGGGGCCA**

**MYRIP** (mRNA: NM\_015460; Posición de la secuencia diana: 4571-4593)

TCCAGTACTCCTTGCTGATGCTGTGTTATGTGTATCTAACAGAAATGACTCCTTTGAAATAAGTAAATCTTTGGCTTTTT  
 GTTCTGTTGGTGTGATTCAAAGCAAAACAAACAAACAAATTTTAAGAACACAACAAAAAGATTTGACTTCCGAA  
 TAGAATGTTTTCTTAAGAGGCATGAAAAGCAACTATTGTTGTGTACAGTGTTAAAAATATTCAGTTTTCTTTGACAAAA  
 ATGCTGTACTGTGTAAGCCTTGCAACAAAAAACACAAAAAAGAAGCAGCAGCAGCAGCCTGCTGTGTGGCATCTGAACCT  
 TTATAAAGGTTTCCTT**GTGCCAA**ATAAGTGCAAGATTTAATTTACTATTAAAAACCATAAGCATATGTTATAGTTCCAGA  
 AGAATTATTTTGCATCAAGTGATTTTGATCTTTAGTGTCAATATTTATATTTAGATTAATTTTTTATAAATGAAAATATTT  
 TAATGGTTTAAAGAAATGAGGACAACAGGATAATATCTTTGATGACTTCTGAAAGTTATGCTTCCCTTCATGTTATATGCA  
 CATTGCCAAGAATTACTGTCAAGAGAAATGATAAGTAAAGTCATTTATGAAAATAAAGATTGTGTGTGTGCAATTTTTTG  
 GTTAAGGGAGACTAGGAGTGAGTAGGG**GATAGGGAAAGAAGTCATGTGGC**

**ODF2 (ISO2)** (mRNA: NM\_153437; Posición de la secuencia diana: 2264-2286)

GGCCCGCATACCAAGATGAGCTGCACGCCCCCAAGGGAGGACTACTTCTTTTTCTTGGCTGCTGCTTTTTTAAAGGAGT  
 GAGCTATCATCAGTGCTGTGAAATAAAAGTCTGGT**GTGCCAA**ATGCCATGTGTTGCACAAAGTGATTGTAGTTATAGGAG  
 CCGTCACCTTGGCTGGAGTCACTGGGCCCTCCTGCTGTTGCCCCACCCAAGACTGCTGCCTCTG**CCTGTGTCTCCGCAGC**  
**TG**

**RYK** (mRNA: NM\_001005861; Posición de la secuencia diana: 2254-2276)

AACACCGTGCCTTAGAAATGCTTTAGAAATCTGAACCTTTTTAAGACAGACTTAATAATGTGGCATATTTCTAGATATCACT  
 TTTATTAGGTTGAACTGAAAGGGTTTTTGTAAATTTTTTGGCCAAAATTTTTTAAACATACTTACTTTGGACTAGGGGTA  
 CATTCCTACAAAATAAATAACAGTTTTTAAATTTGTTTAGACACAGATATTTGGAATTAGCTATCTTA**GTGCCAA**CTGCT  
 TTTTATTTTTTTTACTTCATCAAGGTGATGTAAGTGACTCACCTTTAAAGTTTTTTAGTGTTATTTTTTATCACTACTCTG  
 GGAAATGGTTTTGCTTCAAGATGCAATACTTTTCTTAGTAAAGGAAAAACAGCATAA**AAAGATACC**TGGTCTGCCTTG**TAC**  
**A**

Fragmentos génicos clonados para probar la funcionalidad de los alelos mutantes del miR-96 en los ensayos de luciferasa. En cada caso se indica el nombre del gen, el identificador de la secuencia del mRNA y la posición que en ella ocupa la diana para el miR-96 (subrayada). La secuencia destacada en amarillo es complementaria a la región *seed* del alelo silvestre de miR-96 que será mutagenizada y cambiada por un sitio de corte para la enzima de restricción Sall. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación aparecen resaltados en verde.

## Anexo 2B

### *COL2A1* (mRNA NM\_001844: 5004-5025)

CTCTGCACTGAATGGCTGACCTGACCTGATGTCCATTCATCCACCCCTCTCACAGTTCCGGACTTTTCTCCCCCTCTCTTTCT  
AAGAGACCTGAACTGGGCAGACTGCAAAATAAAATCTCGGTGTTCTATTTATTTATTGTCTTCTGTAAGACCTTCGGGTC  
AAGGCAGAGGCAGGAACTAACTGGTGTGAGTCAAATGCCCCCTGAGTGACTGCCCCCAGCCAGGCCAGAAGACCTCCCT  
TCAGGTGCCGGGCGCAGGAAGTGTGTGTCTTACACAATGGTGCTATTCTGTGTCAAACACCTCTGTATTTTTTAAACA  
TCAATTGATATTAATAATGAAAAGATTATTGGAAAGTACATATTGACTTGTGGTTTGTCTTTAGTTTGTTCATTAAT  
CCTCCGTTCTGTAGGCATG

### *MYO1B* (mRNA NM\_012223: 4709-4730)

AATTTACAAGGGTTCAATTTGGAACTACATTTTAACTTTGGAATCAAATTGTTTCTTATTTGGGAGGATAATGTATATA  
CATTGGTATTATGTTAAATAATAAAATGTTCTAATTTGGTGCCATTTTCTGAATCACAACCTGTATTTTTGTATCTCAAGC  
TATTTTCATATGTTATGTGTCAAATGTTATCATCTCTCAGAAAGGTTTACAATCCAAACA

### *SEMA6D* (mRNA NM\_020858: 3882-3903)

AGCTCACAGGGGCTACCTTACCAGTATAAAGAGCTGATAACAGTACTCAGAAGAATCTGTGAACAAATACTTGAAAATGGG  
TTCAATGTAGACTGCCATTATGTGTGGTCTTCCCATTAATGTGAACATTTTAAATATGTATGCATTACCTTGCTCTTG  
ACAAAAGTCAAATAAAGATGGTAATATCTCAAAGAAATGAAGTGTAGATTACCAAGCAGTTTGTCTAAAAATTCATCTT  
TGACCCAAGCTGTAGCAT

### *ZIC1* (mRNA NM\_003412: 2805-2826)

TTTGTACTGAATGGCAAGAATGTTCTAGTAAATGTGTACCAAAATGTGAATTACTTTGTACGATTACAGTCTCCACGTGCA  
CCTAACCCAAATATTATTGGTATTAATGTGCTTTTTTTGTATAAAGTGCAAACATTTTCGTCCCAAAGTCTAAGTACTTTAGT  
GCAGTAAATGTTGTTTCATGTCCTGTCAAGAATTCGTATAGTACGAGCCTGGATCTGCGTGTCAAACCTGTTCCATTGTT  
TATGTAAAGTGATATTAATAAAGATATAAACTATAAAGTGTCCGTTACTTTTGGCAAA

Fragmentos génicos clonados para probar la funcionalidad del alelo mutante miR-96 +13G>A en los ensayos de luciferasa. En cada caso se indica el nombre del gen, el identificador de la secuencia del mRNA y la posición que en ella ocupa la diana para el miR-514 (subrayada). La secuencia destacada en amarillo es complementaria a la región *seed* del alelo mutante miR-96 +13G>A. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación aparecen resaltados en verde.



Anexo 2C***SLC19A2*** (mRNA NM\_006996: 2603-2624)

CATATGCTTCCCAGAGAAGCTCATTTAGTTAGAAAATAAGGCAAGTTTGAAGCCTGCTAAATGAAGAGACTTAAGAAAGC  
TTAAGGTACGCTTGCTTGTCTTTAAATCTTCAATATGAAGGACTATTAATTCCAAGATTAAAAGTTCATATATAGGCTAAA  
GATGTAAC TAGGCCATTTGTATTTGTATTCCTTTTATTTCCAAAATAAAATGAAAAATCTTTTTTAAATAATTTTCATCCC  
TATTTATAGTTTTTATATTAATTTGTTTTTCTTATCCAAGTAAAGATGTCAATAGGAATTGCATTAGTCCAAGGCCTTTTT  
CATAAACTGAGCCTCTTTTCAATTATTTCAATGGGACAGGAAGTATAGATGTGATTCCTGCATTTTTTTACCTTAAAT  
CTGCCTTTGTTTTCTAAAGGTAGATCATCTTGAATATTTGCTTAAAATTGCTAGTGATTTTCATTACCAAGTTACTTGAAAA  
ATGTTCTATATGCATTTAATTTCTGAAATCAGTCTACCAAGGGGCTGCTAGT

***FMNL2*** (mRNA NM\_052905: 5345-5366)

CTCTTTAATTCCCACCTAAGCCTCTGGGTAATATTGTAAATATTGTTTTAAAATGCATCAGCCTATGCTATACAATCTGAA  
TGTTATTTTAACTTATAGTTTTTTTTTAATATATATATTTAACTATAAGGACAGTTTAGGGAACAAGTTACCTACCACATTT  
CACTTTAGTGACCTATTTACAGAAAGATTAACTGCCACCTGCGGGCACATTCCCATAAATGTGTACTTTACTTTAAAAA  
GAACATGCCACGATTTTGTCTTTCTGTGGACTCAACATTCACCTCGATTAAAAATAGCAATTTGACCAAGTTGGACTTCCA  
CTACAAAGCAGCTGTTTCCAAAATTCAATGCTGACATATATGTATATTAAAATAATTGCCTATTTATTAATCTACAAATA  
GACAAAGTTGGCATGTTCTTTTCTGTTT

***TJPI*** (mRNA NM\_003257: 6054-6075)

CATGTTTGATTTGACGGGACTGTTGGTATTGGCTAGAGTTCAAAGATATTTTGCTTTGTGATTTTGTAAATTTTTTTAT  
CGTCACTGCTTAACTTCACATATTGATTTCCGTTAAAATACCAGCCAGTAAATGGGGGTGCATTTGAGGTCTGTTCTTTCC  
AAAGTACACTGTTTCAAACCTTACTATGGCCCTGGCTAGCATACTACACATTTTATTTTATTATGCATGAAGTAATATG  
CACACATTTTTTAAATGCACCTGGAATATATAACCAGTGTTGTGGATTTAACAGAAATGTACAGCAAGGAGATTTACAAC  
GGGGGAGGGTGAAGTGAAGACAATGACTTACTGTACATGAAACACATTTTCTTAGGGAAGGATACAAAAGCATGTGAGA  
CTGGTTCCATGGCCTCTTCAGATCGATCTCTAACTTCACCATATTACCACAGACATACTAACAGCAGAAATGCCTTACCC

***MYLK*** (mRNA NM\_053025: 7282-7303)

TGGCCACGATGAAACAGATTTCAACTGATAAAGAGCTGGAGAATCCATGTACTTTGGAATCTCCTCCAAGATAGCCAGAG  
TTTAATACATCTTCATTCTCAACACTCTCCAAAGAACTTGACCTACCTTATGGGTTCATATTTTTCTTCTTAAATGTGCA  
TCAATCATGCCTTGCCCCAACCTTTAAATATATCTTAGACCTGGTAAATGCACCTCAGACTTGCGTCTTTAGGAATTTTT  
AAGTTCTTTTCACTACATTGGCACTTAAATTTTTCTTTATAAAGCTTTTTGAAGGTCATAAACAAAGACCATAATTGATG  
ATAGACCTAATACATTTCTCTGTGTGTGTGTGAACAATCCAAATACCTTTTCTTTTCCACTGTTTGTAAAGTGCA  
ACAATTTAATATTTTTAAGGGACTTTTTAAGAGTTCCTTAAGAACCAATTTAAAATTACTTCAGTGCAATCCTACACAGTA  
TCAACATTAGAATTTTGATATTAGTCTTATGTTATCTTCATTCTATTTTTATCTGCTTTTGTGCTAGTTTCAAACCTGC  
CAGTATTTTTCTTTTGCTTTTAAAATAGTTACAATATTTTTTCTATGATAGCCACAGTATTGCCACAG

***LMX1A*** (mRNA NM\_177398: 1513-1534)

CCATATTCTTTGAGGGGTCACCTGGCTTTAGGACAGGGAGGCCAGGGAAGAGGTGGGTTGGGGAGGGAGTTTTGTTGGGGAT  
GCTGTTGTATAATGATATGGTGTAGCTCAGCATTTCCAAAAGACTGAATACATTATGGATTGCATAGTTTAAATGTTTCTAAT  
AAGAGTCTTAGCATTAGATATGAAGACGTGTTTATCATTAAGGACAGAGACTTTTAAATATAGACATTCTCATGCAAACTAG  
ATACTTAGGGACTCCTAACAACTTCCCACCATGTC

Fragmentos génicos clonados para probar la funcionalidad del alelo mutante miR-96 +14C>A en los ensayos de luciferasa. En cada caso se indica el nombre del gen, el identificador de la secuencia del mRNA y la posición que en ella ocupa la diana para el alelo miR-96 +14C>A (subrayada). La secuencia destacada en amarillo es complementaria a la región *seed* del citado alelo. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación aparecen resaltados en verde.



# **PUBLICACIONES**



Las publicaciones que reflejan lo expuesto en esta memoria de Tesis Doctoral son las siguientes:

Modamio-Høybjør S, Moreno-Pelayo MA, **Mencía A**, del Castillo I, Chardenoux S, Morais D, Lathrop M, Petit C, Moreno F. A novel *locus* for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA50, maps to chromosome 7q32 between the DFNB17 and DFNB13 deafness loci. *J Med Genet*. 2004 Feb; 41(2):e14.

**Mencía A**, Modamio-Høybjør S, Redshaw N, Morín M, Mayo-Merino F, Olavarrieta L, Aguirre LA, del Castillo I, Steel KP, Dalmay T, Moreno F, Moreno-Pelayo MA. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nat Genet*. 2009 May; 41(5):609-13.

Otras publicaciones relacionadas con el tema del presente trabajo:

Morín M, Bryan KE, Mayo-Merino F, Goodyear R, **Mencía A**, Modamio-Høybjør S, del Castillo I, Cabalka JM, Richardson G, Moreno F, Rubenstein PA, Moreno-Pelayo MA. In vivo and in vitro effects of two novel gamma-actin (*ACTG1*) mutations that cause DFNA20/26 hearing impairment. *Hum Mol Genet*. 2009 Aug 15; 18(16):3075-89

Moreno-Pelayo MA, Goodyear RJ, **Mencía A**, Modamio-Høybjør S, Legan PK, Olavarrieta L, Moreno F, Richardson GP. Characterization of a spontaneous, recessive, missense mutation arising in the *Tecta* gene. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2008 Jun; 9(2):202-14.

**Mencía A**, González-Nieto D, Modamio-Høybjør S, Etxeberria A, Aránguez G, Salvador N, Del Castillo I, Villarroel A, Moreno F, Barrio L, Moreno-Pelayo MA. A novel KCNQ4 pore-region mutation (p.G296S) causes deafness by impairing cell-surface channel expression. *Hum Genet*. 2008 Feb; 123(1):41-53.

Modamio-Hoybjør S, **Mencia A**, Goodyear R, del Castillo I, Richardson G, Moreno F, Moreno-Pelayo MA. A mutation in *CCDC50*, a gene encoding an effector of epidermal growth factor-mediated cell signaling, causes progressive hearing loss. *Am J Hum Genet*. 2007 Jun; 80(6):1076-89.

Moreno-Pelayo MA, Modamio-Høybjør S, **Mencia A**, del Castillo I, Chardenoux S, Fernández-Burriel M, Lathrop M, Petit C, Moreno F. DFNA49, a novel *locus* for autosomal dominant non-syndromic hearing loss, maps proximal to DFNA7/DFNM1 region on chromosome 1q21-q23. *J Med Genet*. 2003 Nov; 40(11):832-6

Modamio-Høybjør S, Moreno-Pelayo MA, **Mencia A**, del Castillo I, Chardenoux S, Armenta D, Lathrop M, Petit C, Moreno F. A novel *locus* for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (DFNA44) maps to chromosome 3q28-29. *Hum Genet*. 2003 Jan; 112(1):24-8.

Otras publicaciones resultado de colaboraciones:

Valeri AP, Aguilera-Montilla N, López-Santalla M, **Mencia A**, Rodríguez-Juan C, Gutiérrez-Calvo A, Martín J, Lasa I, García-Sancho L, Granell J, Pérez-Blas M, Martín-Villa JM. Herpesvirus saimiri transformation may help disclose inherent functional defects of mucosal T lymphocytes in patients with gastric adenocarcinoma. *Immunol Cell Biol*. 2008 Mar-Apr; 86(3):289-91.

Mancebo E, Moreno-Pelayo MA, **Mencia A**, de la Calle-Martín O, Allende LM, Sivadorai P, Kalaydjieva L, Bertranpetit J, Coto E, Calleja-Antolín S, Ruiz-Contreras J, Paz-Artal E. Gly111Ser mutation in CD8A gene causing CD8 immunodeficiency is found in Spanish Gypsies. *Mol Immunol*. 2008 Jan; 45(2):479-84.

Mancebo E, Moreno-Pelayo MA, **Mencia A**, de la Calle-Martín O, Allende LM, Sivadorai P, Kalaydjieva L, Bertranpetit J, Coto E, Calleja-Antolín S, Ruiz-Contreras J, Paz-Artal E. Gly111Ser mutation in CD8A gene



---

causing CD8 immunodeficiency is found in Spanish Gypsies. *Mol Immunol.* 2008 Jan; 45(2):479-84.

Recio MJ, Moreno-Pelayo MA, Kiliç SS, Guardo AC, Sanal O, Allende LM, Pérez-Flores V, **Mencía A**, Modamio-Høybjør S, Seoane E, Regueiro JR. Differential biological role of CD3 chains revealed by human immunodeficiencies. *J Immunol.* 2007 Feb 15; 178(4):2556-64.

Aguilera-Montilla N, Pérez-Blas M, Valeri AP, López-Santalla M, Rodríguez-Juan C, **Mencía A**, Castellano G, Luisa Manzano M, Casis B, Sánchez F, Martín-Villa JM. Herpesvirus saimiri (HVS)-transformed T-cell lines: a method to study mucosal T cells in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2006 Nov; 41(11):1361-3.

Aguilera-Montilla N, Pérez-Blas M, Valeri AP, López-Santalla M, Rodríguez-Juan C, **Mencía A**, Castellano G, Manzano ML, Casis B, Sánchez F, Martín-Villa JM. Higher proliferative capacity of T lymphocytes from patients with Crohn disease than from ulcerative colitis is disclosed by use of Herpesvirus saimiri-transformed T-cell lines. *Scand J Gastroenterol.* 2004 Dec; 39(12):1236-42.